

Klinik für Reproduktionsmedizin
der Vetsuisse-Fakultät Universität Zürich

Direktor: Prof. Dr. Heiner Bollwein

Arbeit unter wissenschaftlicher Betreuung von
Dr. Johannes Lüttgenau

**Einfluss von Lipopolysaccharid auf das Corpus luteum
am isoliert perfundierten Ovar des Rindes**

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung der Doktorwürde der
Vetsuisse-Fakultät Universität Zürich
vorgelegt von

Benjamin Möller

Tierarzt

aus Zofingen, Aargau

genehmigt auf Antrag von
Prof. Dr. med. vet. Heiner Bollwein, Referent
Prof. Dr. agr. Rupert Bruckmaier, Korreferent

2015

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis	2
Zusammenfassung	3
Summary	4
1. Einleitung	
1.1. Fertilität und Inflammation bei Milchkühen	5
1.2. Lipopolysaccharide	5
1.3. Mechanismen der physiologischen Luteolyse beim Rind	7
1.4. Mögliche Mechanismen einer LPS-induzierten Luteolyse	8
1.5. Die isolierte Ovarperfusion	10
1.6. Einführung zu den gemessenen Parametern	13
1.7. Fragestellung	15
2. Material und Methoden	
2.1. Ovarspendertiere	16
2.2. Entnahme der Ovarien	16
2.3. Perfusion im Laboratorium	18
2.4. Behandlungsgruppen	22
2.5. Bestimmung von Glukose, Laktat, LDH, CK, P ₄ und PGF _{2α}	22
2.6. Expressionsanalyse	24
2.7. Statistische Analyse	25
3. Ergebnisse	
3.1. Perfusionsanalyse	29
3.2. Hormonanalyse	33
3.3. Expressionsanalyse	34
4. Diskussion	38
5. Referenzen	45
Danksagung	55
Curriculum Vitae	56

Zusammenfassung

Einfluss von Lipopolysaccharid auf das Corpus luteum am isoliert perfundierten Ovar des Rindes

Lipopolysaccharid (LPS), das Endotoxin Gram-negativer Bakterien, beeinträchtigt die Struktur und Funktion des bovinen Corpus luteum (CL) *in vivo*. Um zu untersuchen, ob diese Effekte direkt durch den LPS-induzierten Tumornekrosefaktor- α (TNF α) oder durch PGF_{2 α} vermittelt werden, wurden bovine Ovarien mit Blütegelbkörper direkt nach der Schlachtung entnommen und für 240 min isoliert perfundiert. Nach 60 min Äquilibration wurde dem Medium bei fünf von elf Ovarien 0.5 μ g/ml LPS zugefügt. Nach 210 min Perfusion wurden alle Ovarien mit 500 I.E. hCG behandelt. Im Perfusat wurde die Konzentration von P₄ und PGF_{2 α} alle 10 bzw. 30 min gemessen. Biopsien des CL wurden alle 60 min für eine RT-qPCR entnommen, um die mRNA Expression der Rezeptoren für LPS (*TLR2*, *-4*) und LH (*LHCGR*), des Zytokins TNF α , der steroidogenen (*STAR*, *HSD3B*), angiogenen (*VEGFA*₁₂₁, *FGF2*) und vasoaktiven (*EDN1*) Faktoren, und der Faktoren der Prostaglandinsynthese (*PGES*, *PGFS*, *PTGFR*) und Apoptose (*CASP3*, *-8*, *-9*) zu bestimmen. Während LPS den hCG-induzierten P₄-Anstieg verhinderte ($p \leq 0.05$), beeinflusste es die PGF_{2 α} -Sekretion nicht ($p > 0.05$). Die mRNA Expression von *TLR2*, TNF α , *CASP3*, *-8*, *PGES*, *PGFS* und *VEGFA*₁₂₁ war nach LPS-Gabe erhöht ($p \leq 0.05$), während alle anderen Faktoren unverändert blieben ($p > 0.05$). Die reduzierte P₄-Sekretion nach hCG-Gabe in LPS-behandelten Ovarien *in vitro* war nicht auf erhöhtes PGF_{2 α} oder eine reduzierte Steroidogenese, sondern auf eine erhöhte Expression von TNF α und Apoptose zurückzuführen.

Summary

Effect of lipopolysaccharide on the corpus luteum in the isolated perfused bovine ovary

Lipopolysaccharide (LPS), the endotoxin of gram-negative bacteria, has detrimental effects on structure and function of the bovine corpus luteum (CL) *in vivo*. To investigate whether these effects are mediated directly by LPS-induced tumor necrosis factor α (TNF α) or by PGF_{2 α} , bovine ovaries with a mid-cycle CL were collected immediately after slaughter and isolated perfused for 240 min. After 60 min of equilibration, 0.5 μ g/mL LPS were added to the medium in five of eleven ovaries. After 210 min of perfusion, all ovaries were treated with 500 IU of hCG. In the effluent perfusate, concentrations of P₄ and PGF_{2 α} were measured every 10 and 30 min, respectively. Biopsies of the CL were collected every 60 min and used for RT-qPCR to evaluate mRNA expression of receptors for LPS (*TLR2*, -4) and LH (*LHCGR*), the cytokine *TNF α* , steroidogenic (*STAR*, *HSD3B*), angiogenic (*VEGFA*₁₂₁, *FGF2*) and vasoactive (*EDN1*) factors, and factors of prostaglandin synthesis (*PGES*, *PGFS*, *PTGFR*) and apoptosis (*CASP3*, -8, -9). Although LPS abolished the hCG-induced increase in P₄ ($P \leq 0.05$), it did not affect PGF_{2 α} release ($P > 0.05$). Furthermore, the mRNA abundance of *TLR2*, *TNF α* , *CASP3*, -8, *PGES*, *PGFS*, and *VEGFA*₁₂₁ increased ($P \leq 0.05$) after LPS treatment, whereas all other factors remained unchanged ($P > 0.05$). In conclusion, reduced P₄ responsiveness to hCG in LPS-treated ovaries *in vitro* was not due to increased PGF_{2 α} or reduced steroidogenesis, but was attributed to enhanced expression of *TNF α* and apoptosis.

1. Einleitung

1.1. Fertilität und Inflammation bei Milchkühen

Die Fertilität der Milchkühe nimmt seit mehr als 50 Jahren deutlich ab (Walsh *et al.* 2011). Neben verschiedenen anderen Faktoren beeinträchtigen besonders inflammatorische Erkrankungen die Fruchtbarkeit von Milchkühen in grossem Masse (Barker *et al.* 1998, Fourichon *et al.* 2000, LeBlanc *et al.* 2002). So führt eine Endometritis zu einer verlängerten Güstzeit oder sogar zum vorzeitigen Abgang der Kuh aus der Herde (LeBlanc *et al.* 2002), wobei die Störung der ovariellen Funktion proportional zur Menge der pathogenen Bakterien im Uterusinhalt ist (Williams *et al.* 2007). Auch ein entzündlicher Prozess ausserhalb des Genitaltraktes, wie beispielsweise eine Mastitis, führt zu einer Erhöhung des Besamungsindex und zu einer Verlängerung der Güstzeit (Barker *et al.* 1998). Es stehen sehr viele mögliche Mechanismen zur Diskussion, welche für diese Effekte verantwortlich sein könnten. Vielen gemeinsam ist die Aktivierung von Immunzellen, welche wiederum zu einer vermehrten Produktion von Zytokinen führen. Es wird vermutet, dass die Zytokine die Fruchtbarkeit durch eine Erhöhung der Körpertemperatur, eine vermehrte Ausschüttung von Stickstoffoxiden, eine vorzeitige Freisetzung von Prostaglandin (PG) $F_{2\alpha}$ oder eine negative Beeinflussung der Hypothalamus-Hypophysen-Ovar-Achse beeinträchtigen können (Hansen *et al.* 2004).

1.2. Lipopolysaccharide

Bei der Pathogenese der durch Gram-negative Bakterien verursachten Erkrankungen spielt das Endotoxin Lipopolysaccharid (LPS), ein Hauptbestandteil der äusseren Zellwand dieser Bakterien, eine wichtige Rolle. *In vivo* ist LPS in der Zirkulation an das LPS-binding Protein gebunden (Abb. 1). Dieser Komplex aktiviert in den

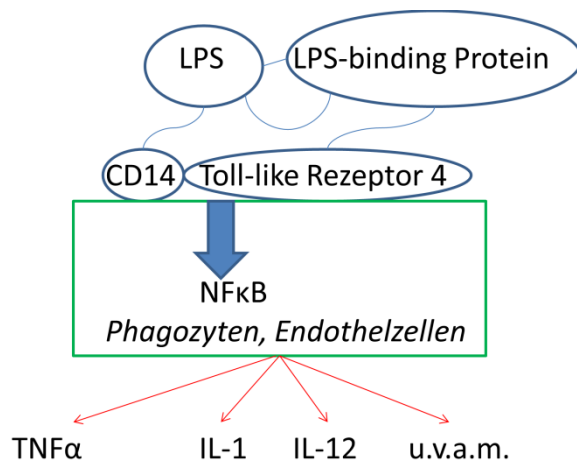


Abb. 1. Wirkungsmechanismus von LPS; modifiziert aus Janeway *et al.* 2002.

Phagozyten und Endothelzellen durch Bindung an den Toll-like Rezeptor (TLR) 4 (seltener TLR2) und den Cluster of Differentiation (CD) 14 Rezeptor Transkriptionsfaktorenkomplex Nuclear factor ,kappa-light-chain-enhancer' of activated B-cells (NFκB). Dessen Aktivierung

wiederum führt zur Expression von etwa 100 Genen, welche unter anderem wichtige Zytokine wie Tumornekrosefaktor-α (TNFα), Interleukin 1 (IL-1) und Interleukin 12 (IL-12) kodieren (Janeway *et al.* 2002). Diese Zytokine führen dann zu einer starken Aktivierung der Leukozyten, was sich unter anderem in einer erhöhten Produktion von Stickstoffoxiden (NO_x) zeigt. Blum *et al.* (2000) wiesen beispielsweise nach einer mittels intramammärer Instillation von *E. coli*-Endotoxin experimentell induzierten Mastitis einen systemischen Anstieg von TNFα und NO_x nach.

Lipopolysaccharide vermindern die Fertilität von Kühen unter anderem durch eine Störung der Follikulogenese und der Ovulation (Suzuki *et al.* 2001, Lavon *et al.* 2008, Williams *et al.* 2008). Bei Kühen, die während des Proöstrus mit LPS behandelt

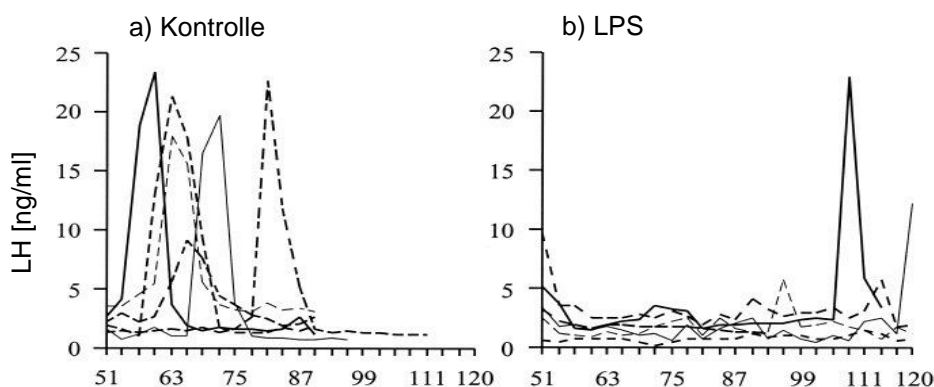


Abb. 2. Verzögerung respektive Verhinderung des LH-Peaks im Vergleich zur Kontrolle (a) nach einer Behandlung mit LPS im Proöstrus (b); Suzuki *et al.* 2001.

wurden, erfolgte der Luteinisierendes Hormon (LH)-Peak entweder stark verspätet oder blieb sogar ganz aus (Abb. 2; Suzuki *et al.* 2001).

Ausserdem kann LPS zu einer Beeinträchtigung der morphologischen und funktionellen Integrität des Corpus luteum (CL) führen. So bedingte eine intravenöse Verabreichung von LPS bei Kühen einen signifikanten Anstieg von $\text{PGF}_{2\alpha}$ -Metaboliten (PGFM; Gilbert *et al.* 1990, Giri *et al.* 1990, Jackson *et al.* 1990, Giri *et al.* 1991, Herzog *et al.* 2012), eine Reduktion der Progesteron (P_4)-Produktion (Gilbert *et al.* 1990, Giri *et al.* 1990, Jackson *et al.* 1990, Giri *et al.* 1991, Herzog *et al.* 2012) und eine temporäre Abnahme der Grösse und Durchblutung des CL (Herzog *et al.* 2012). Bei Tieren, die im ersten Trimester gravid waren, konnten Aborte beobachtet werden (Giri *et al.* 1991).

Bis heute ist unklar, wie genau der negative Einfluss von LPS auf das CL vermittelt wird. Um mögliche Mechanismen zu erkennen, bedarf es eines genauen Verständnisses des Ablaufs der physiologischen Luteolyse beim Rind.

1.3. Mechanismen der physiologischen Luteolyse beim Rind

Die physiologische Luteolyse wird beim Rind durch $\text{PGF}_{2\alpha}$ ausgelöst. Bei einem Ausbleiben der Synthese von Interferon- τ durch den Embryo wird $\text{PGF}_{2\alpha}$ am Ende des Diöstrus im Endometrium gebildet und gelangt *via* venös-arteriellen Gegenstromaustausch unter Umgehung des grossen Kreislaufs direkt vom Uterus zum Ovar. Es werden generell zwei Phasen der Luteolyse unterschieden. Initial erfolgt eine Abnahme der P_4 -Synthese, was mit der funktionellen Luteolyse gleichzusetzen ist, und anschliessend kommt es zur Apoptose von Luteal- und Endothelzellen, was der strukturellen Luteolyse entspricht (Chedrese 2009). Die $\text{PGF}_{2\alpha}$ -Wirkung wird dabei über viele verschiedene Second Messenger, wie zum Beispiel Endothelin 1 (EDN1),

TNF α , NO $_x$ und luteales Oxytocin (OT), sowie durch PGF $_{2\alpha}$ selbst vermittelt (Skarzynski *et al.* 2008).

Zwei Aspekte der physiologischen Luteolyse sind für die vorliegende Arbeit von besonderer Bedeutung: Erstens sind mehrere Mediatoren, wie zum Beispiel TNF α oder auch NO $_x$ sowohl an der Vermittlung der Auswirkungen von LPS auf den Organismus als auch von PGF $_{2\alpha}$ auf das bovine CL beteiligt. Zweitens kommt es im Rahmen der physiologischen Luteolyse nicht nur im Endometrium, sondern auch im CL selbst zur Bildung von PGF $_{2\alpha}$ (Wiltbank & Ottobre 2003, Niswender *et al.* 2007).

1.4. Mögliche Mechanismen einer LPS-induzierten Luteolyse

Eine Verbindung zwischen den LPS-abhängigen und den an der physiologischen Luteolyse beteiligten Signalkaskaden stellt möglicherweise TNF α dar. Dieses Zytokin stimuliert in den stromalen Zellen des Endometriums die Bildung von PGF $_{2\alpha}$, jedoch nicht nur in der follikulären (wie OT), sondern auch in der lutealen Phase des Zyklus (Jaroszewski *et al.* 2003). Die Freisetzung von PGF $_{2\alpha}$ aus dem Endometrium wird von verschiedenen Autoren als möglicher Mechanismus der Auslösung einer vorzeitigen Luteolyse unter LPS-Einfluss angesehen (Giri *et al.* 1991, Miyamoto *et al.* 2000, Skarzynski *et al.* 2000). Aus neueren Studien liegen aber Hinweise darauf vor, dass durch LPS unabhängig von der Induktion einer endometrialen Ausschüttung von PGF $_{2\alpha}$ ein schädlicher Einfluss auf das CL ausgeübt werden kann. So induzierte LPS in den Zellen einer Monolayer-Lutealzellkultur oxidativen Stress und Apoptose über die intrinsische oder mitochondriale Signalkaskade, d.h. unter Aktivierung der Caspase (CASP) 9 (Mishra & Dhali 2007). In der *in vitro* Studie von Mishra und Dhali (2007) war eine Beteiligung von TNF α aus Leukozyten oder Endothelzellen sowie von endometrialem PGF $_{2\alpha}$ ausgeschlossen. Bemerkenswert im Vergleich zur letztgenannten Studie ist zudem, dass im Rahmen der physiologischen Luteolyse die

Apoptose der Lutealzellen eher über die extrinsische Signalkaskade, d.h. über eine Aktivierung der CASP8 durch den Todesrezeptor Fas, vermittelt wird (Chedrese 2009).

Im Rahmen von *in vivo* Studien wurde versucht, durch eine Verabreichung von Cyclooxygenase (COX)-2-Hemmern (Giri *et al.* 1991, Scenna *et al.* 2005, Merrill *et al.* 2007, Erdem & Guzeloglu 2010, Rabaglino *et al.* 2010, von Krueger & Heuwieser 2010, Heuwieser *et al.* 2011, Rossetti *et al.* 2011, Geary 2012) oder durch Fütterung von Ergänzungsfuttermitteln mit erhöhtem Gehalt an Ω -3 Fettsäuren (Mattos *et al.* 2002) die Synthese von $\text{PGF}_{2\alpha}$ zu vermindern und so die Fertilität zu erhöhen. Die Resultate dieser Studien waren jedoch höchst widersprüchlich. Lediglich in drei der erwähnten Studien (Giri *et al.* 1991, Scenna *et al.* 2005, Merrill *et al.* 2007) konnte ein positiver Effekt auf die Trächtigkeitsrate nachgewiesen werden.

Von besonderer Bedeutung ist die Arbeit von Giri *et al.* (1991), in der eine intravenöse Applikation von LPS an im ersten Trimester tragenden Kühen unter anderem zu einem Anstieg der $\text{PGF}_{2\alpha}$ - und einem Abfall der P_4 -Konzentration sowie zu Aborten führte. Wurde vor und nach der LPS-Applikation der COX-2-Hemmer Flunixin meglumin appliziert, reduzierten sich die Veränderungen im $\text{PGF}_{2\alpha}$ - und P_4 -Spiegel und die Aborte blieben aus. Das Ausbleiben von positiven Effekten auf die Fertilität nach Hemmung der $\text{PGF}_{2\alpha}$ -Freisetzung in den anderen genannten Studien könnte durch die Verwendung klinisch gesunder Kühe bedingt sein (Rabaglino *et al.* 2010, von Krueger & Heuwieser 2010, Heuwieser *et al.* 2011, Rossetti *et al.* 2011, Geary 2012). Daneben wäre es jedoch auch möglich, dass nicht die Ausschüttung von uterinem $\text{PGF}_{2\alpha}$ die vorzeitige Luteolyse und damit die Fertilitätsreduktion bedingt, sondern dass bakterielle Toxine oder Zytokine wie LPS bzw. $\text{TNF}\alpha$ die Luteolyse direkt verursachen (Abb. 3). Auf Grund der kleinen Tierzahl und der fehlenden Untersuchungen auf molekularbiologischer Ebene lassen sich aus der Arbeit von Giri *et al.*

(1991) unter Berücksichtigung der neuen Erkenntnisse aus den letzten 20 Jahren bislang keine definitiven Schlussfolgerungen ziehen, welche Faktoren für die beobachtete Luteolyse verantwortlich sind. Zusammenfassend ist daher festzustellen, dass LPS zwar einen negativen Einfluss auf das CL ausübt, der Wirkmechanismus allerdings noch unklar ist.

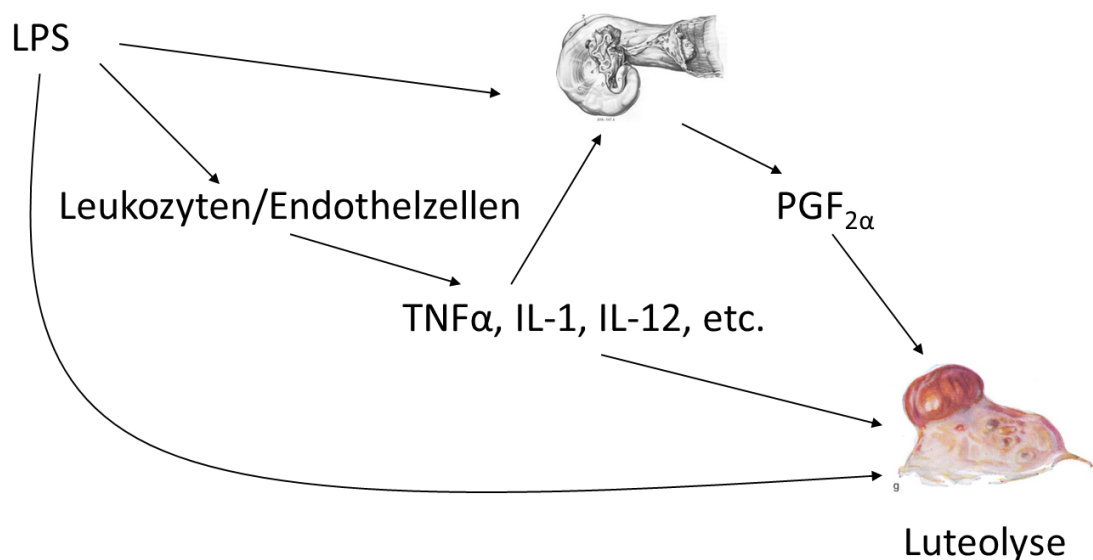


Abb. 3. Drei mögliche Mechanismen einer LPS-induzierten Luteolyse: Durch LPS ausgelöste endometriale $\text{PGF}_{2\alpha}$ -Sekretion (oben), durch LPS ausgelöste Sekretion von Entzündungsmediatoren in Leukozyten oder Endothelzellen (Mitte) und direkte luteolytische Wirkung von LPS ohne Mitbeteiligung von $\text{PGF}_{2\alpha}$ oder anderer Entzündungsmediatoren (unten); Bilder entnommen aus Lehrbuch der Anatomie der Haustiere, Nickel et al., Band 2, Auflage 9.

1.5. Die isolierte Ovarperfusion

Das Modell des isoliert perfundierten Ovars wurde bereits vor vielen Jahren entwickelt und in zahlreichen Studien angewendet. Dabei wurden sowohl Ovarien von Menschen (Stahler *et al.* 1971, Abrahamsson *et al.* 1990, Richter *et al.* 2000), als auch von Labortieren (Bjersing *et al.* 1981, Koos *et al.* 1984, Dharmarajan *et al.* 1988, Coskun *et al.* 2009, Ingec *et al.* 2011) und Wiederkäuern (Romanoff & Pincus 1962, Mills & Morrisette 1970, Stahler & Huch 1971, Sturm & Stahler 1971, Janson *et al.* 1978) unter Laborbedingungen isoliert perfundiert. Die meisten dieser Studien

hatten das Ziel, entweder die Ovulation, die Steroidbiosynthese oder den Energiemetabolismus des Ovars genauer zu erforschen.

Ein Ziel der vorliegenden Studie war es, ein weiterentwickeltes Modell des isoliert perfundierten Rinderovars zu etablieren, das sich sowohl für die Untersuchung der Steroidbiosynthese des CL als auch der lutealen Genexpression eignet. Dabei wurde Wert auf eine kontrollierte Perfusion unter exakt vorgegebenen Bedingungen gelegt, um auch schwächer ausgeprägte Effekte einer Endotoxin-Behandlung detektieren zu können.

Hinsichtlich der Untersuchung der Auswirkung von LPS auf das bovine CL bietet das Modell des isoliert perfundierten Ovars mehrere Vorteile gegenüber *in vivo* oder anderen *in vitro* Methoden, wie beispielsweise Zellkulturstudien. Die *in vivo* untrennbare Blutversorgung von Uterus und Ovar, durch die Prostaglandin *via* venös-arteriellen Gegenstromaustausch vom Endometrium in das Ovar gelangt, kann bei diesem Modell getrennt untersucht werden. Falls trotz der Ausschaltung des uterinen PGF_{2α} ein luteolytischer Effekt von LPS auf das CL beobachtet werden sollte, könnte dies als Hinweis darauf gewertet werden, dass entweder LPS selbst oder Zytokine, welche unter LPS-Einfluss vermehrt ausgeschüttet werden, für diesen Effekt zumindest mitverantwortlich sind. Es muss jedoch bedacht werden, dass es im Rahmen der physiologischen Luteolyse nach einem initialen Stimulus durch uterines PGF_{2α} auch in den grossen Lutealzellen im CL zur PGF_{2α}-Synthese durch die COX-2 kommt. Fehlt diese luteale PGF_{2α}-Synthese, bleibt die Luteolyse unvollständig (Niswender *et al.* 2007). Es ist daher nicht ausgeschlossen, dass es auch im Modell des isoliert perfundierten Ovars zu einer sekundären, Prostaglandin-vermittelten Luteolyse kommen könnte.

Ein weiterer grosser Vorteil der isolierten Perfusion gegenüber einer *in vivo* Studie liegt in der Vermeidung eines Tierversuchs. Da in früheren *in vivo* Studien mit LPS

nicht nur Effekte auf das CL, sondern auch relativ starke systemische Auswirkungen auf die Versuchskühe beobachtet wurden (Giri *et al.* 1990, Giri *et al.* 1991, Herzog *et al.* 2012), ist dies nicht nur ein ökonomischer Vorteil, sondern stellt auch einen grossen Vorteil hinsichtlich des Tierschutzes dar.

Gegenüber Zellkulturstudien hat die isolierte Perfusion ebenfalls bedeutende Stärken. So sind im isoliert perfundierten Ovar vaskuläre und stromale Faktoren weitgehend vorhanden und es sind Interaktionen zwischen den verschiedenen Zellen möglich. Diese Interaktionen sind unabdingbar für die Gewährleistung der physiologischen Funktion beteiligter Zytokine und Hormone. Prostaglandin $F_{2\alpha}$ beispielsweise zeigte in einer Monolayer-Lutealzellkultur luteotrope und nicht luteolytische Wirkungen (Korzekwa *et al.* 2008). Es muss jedoch auch bedacht werden, dass im Modell des isoliert perfundierten Ovars pathophysiologische Vorgänge nur teilweise ablaufen können und dass allfällige neue Erkenntnisse *in vivo* bestätigt werden müssen, bevor Rückschlüsse auf den Wirkmechanismus im Tier gezogen werden können.

Die in der vorliegenden Studie verwendete Präparationstechnik, der verwendete Perfusionsapparat, die Perfusionstechnik und die verwendeten Medien und Reagenzien leiten sich in weiten Teilen von Erkenntnissen aus den bereits etablierten Studien ab. Wenn möglich, wurden vorgegebene Werte mit Daten aus neueren *in vivo* Studien abgeglichen. Der in älteren Studien dokumentierte optimale Perfusionsfluss für Rinderovarien (Stahler und Huch 1971) stimmte beispielsweise relativ genau mit den Blutflusswerten der *Arteria (A.) ovarica* aus einer neueren Dopplersonographie-Studie überein (Honnens *et al.* 2009). Ein kritischer Punkt bei der Versuchsdurchführung ist die Ischämiezeit zwischen der Entnahme der Ovarien aus dem Spendertier und dem Anschluss an den Perfusionsapparat, welche nicht länger als zwei Stunden dauern sollte (Coskun *et al.* 2009).

Die *in vivo* Entnahme von CL-Biopsaten zur mRNA Expressionsanalyse ist beim Rind ein bereits etabliertes Verfahren. Selbst wiederholte Biopsien während eines Zyklus beeinträchtigen die Funktion des CL nicht. Weder die P_4 -Synthese noch die Grösse des CL bzw. die Länge der Lutealphase werden dadurch verändert (Tsai *et al.* 2001, Lüttgenau *et al.* 2011, Slough *et al.* 2011).

1.6. Einführung zu den gemessenen Parametern

Der Glukoseverbrauch, die Laktatproduktion, und die Aktivitäten der Laktatdehydrogenase (LDH) und Kreatinkinase (CK) im Perfusat stellen Marker für die Hypoxie und den Zelltod eines Gewebes dar. Durch die Bestimmung dieser Parameter lässt sich in der vorliegenden Studie die Qualität der Perfusion überprüfen (Stahler & Huch 1971, Richter *et al.* 2000).

Die Produktion von P_4 ist der wichtigste Indikator für eine funktionelle Integrität des CL (Rekawiecki *et al.* 2008, Chedrese 2009). Ein LH-Stimulationstest am Ende der Perfusionszeit lässt bei einem Anstieg der P_4 -Synthese auf eine erhaltene Funktionsfähigkeit des CL schliessen (Skarzynski *et al.* 2008). Prostaglandin $F_{2\alpha}$ ist beim Wiederkäuer der bedeutendste Mediator der Luteolyse (McCracken *et al.* 1999). Da es bei der physiologischen Luteolyse neben einer endometrialen auch zu einer intralutealen $PGF_{2\alpha}$ -Freisetzung kommt (Schams & Berisha 2004, Niswender *et al.* 2007), wird $PGF_{2\alpha}$ in der vorliegenden Studie bestimmt, obwohl in dem gewählten Modell des isoliert perfundierten Ovars kein Endometrium vorhanden ist. Die Konzentrationen von $PGF_{2\alpha}$ und PGE_2 im bovinen CL werden durch deren Synthesen (PGFS und PGES) bestimmt. Das Ausmass der P_4 -Sekretion des CL hängt nicht nur von der Menge des durch die Lutealzellen synthetisierten P_4 sondern auch von der Expression der PGFS (auch 20α -hydroxysteroid Dehydrogenase, 20α HSD) ab, da

diese P_4 in das inaktive Progestin 20α -dihydroprogesteron abbaut (Stocco *et al.* 2007).

Das Steroidogenic acute regulatory protein (STAR) ist am Cholesteroltransport vom Zytoplasma in die Mitochondrien der Lutealzellen beteiligt. Dieser Prozess ist der limitierende und am schnellsten durch Second Messenger beeinflusste Schritt der P_4 -Synthese und kann deshalb als hochempfindlicher Marker für eine beginnende Luteolyse verwendet werden (Stocco & Clark 1996, Niswender 2002). Die Transformation von Pregnenolon in P_4 durch die 3β -hydroxysteroid Dehydrogenase (HSD3B) ist ebenfalls eine Schlüsselstelle der Steroidogenese (Couet *et al.* 1990).

Angiogene Faktoren wie zum Beispiel der Vascular endothelial growth factor (VEGF) oder der Fibroblast growth factor (FGF) 2 sind hochwirksame Mitogene für Endothelzellen, Stimulatoren für die vaskuläre Permeabilität und starke luteotrope Faktoren im CL (Shirasuna *et al.* 2010). Im Gegensatz dazu ist der vasoaktive Faktor EDN1 ein wichtiger Vermittler der luteolytischen Wirkung des uterinen $PGF_{2\alpha}$ auf das bovine CL (Skarzynski *et al.* 2008).

Das Zytokin $TNF\alpha$ kommt sowohl in kleinen und grossen bovinen Lutealzellen als auch in Immunzellen (vor allem Makrophagen) vor (Sakumoto *et al.* 2011). Im Zusammenspiel mit Interferon- γ (IFN- γ) und anderen Substanzen (z.B. EDN1) vermindert $TNF\alpha$ die P_4 -Sekretion, erhöht die $PGF_{2\alpha}$ -Produktion und induziert *in vitro* eine Apoptose der Lutealzellen (Okuda & Sakumoto 2003, Skarzynski *et al.* 2005).

Die CASP3, -8 und -9 spielen sowohl bei der Apoptose der Lutealzellen während der physiologischen Luteolyse (Stocco *et al.* 2007), als auch bei der LPS-vermittelten Apoptose der Lutealzellen *in vivo* (Herzog *et al.* 2012) und *in vitro* (Mishra & Dhali 2007) eine bedeutende Rolle. Als unspezifische Apoptosemarker eignen sie sich aber auch zur Detektion perfusionsbedingter Störungen.

1.7. Fragestellung

- 1) Wie beeinflusst LPS das CL im isoliert perfundierten Ovar des Rindes, besonders hinsichtlich Lutealzellapoptose und Progesteronsynthese?
- 2) Ist LPS für die *in vivo* zu beobachtenden Vorgänge am bovinen CL direkt verantwortlich oder werden diese Effekte indirekt, zum Beispiel durch $\text{PGF}_{2\alpha}$, vermittelt?

2. Material und Methoden

2.1. Ovarspendertiere

Als Ovarspendertiere dienten diöstrische Kühe der Rassen Holstein Friesian, Red Holstein, Swiss Fleckvieh und Brown Swiss, welche am Schlachthof Zürich geschlachtet wurden. Es wurden nur Kühe in die Studie aufgenommen, welche klinisch gesund waren und bei denen weder am Uterus noch an den Ovarien pathologische Veränderungen oder Hinweise auf eine Trächtigkeit feststellbar waren.

2.2. Entnahme der Ovarien

Die Ovarien wurden nach Betäubung, Entblutung und Exenteration der Kühe direkt am Schlachtband entnommen. Vor der Entnahme wurden die Ovarien adspektorisch und palpatorisch auf das Vorhandensein eines CL in Blüte (geschätzter Durchmesser >2 cm) überprüft. Ovarien, bei denen die *Tunica albuginea*, das Mesovar oder die Arterien und Venen durch den Schlachtungsprozess verletzt oder mit Kot verschmutzt waren, wurden nicht verwendet.

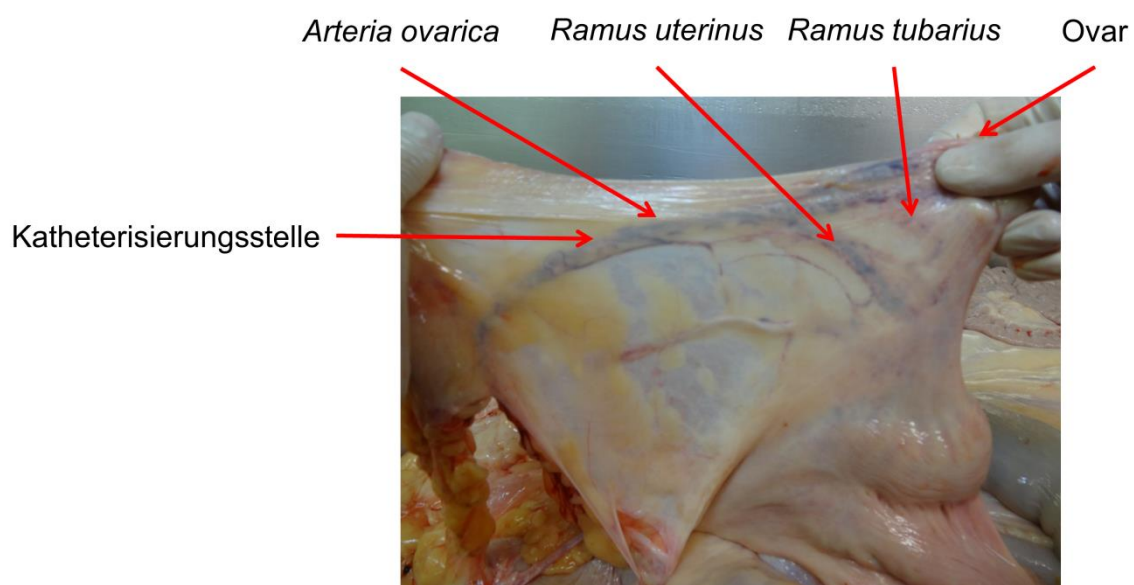


Abb. 4. Topographie des Mesovars vor der Entnahme

Bei der Entnahme wurde speziell darauf geachtet, einen genügend langen Anteil des Mesovars zu erhalten, um die zu- und abführenden Gefässe des Ovars nicht zu verletzen (Abb. 4). Vor der Katheterisierung wurden der *Ramus (R.) uterinus* und einige grössere Äste der *A. ovarica*, welche das Mesovar und die *Bursa ovarica* versorgen, ligiert (Polysorb 0®, Corvidien, Dublin, Irland; Abb. 5). Die Katheterisierung der *A. ovarica* erfolgte unmittelbar proximal des Abgangs des *R. uterinus*, da sich die *A. ovarica* unmittelbar distal dieser Abzweigung in viele kleine Äste aufteilt und ein eng um die *Vena (V.) ovarica* verlaufendes Konvolut bildet, sodass eine Katheterisierung des Gefässes nicht mehr möglich ist. Um die *A. ovarica* zu katheterisieren wurde sie stumpf vom umgebenden Bindegewebe freipräpariert, gestreckt und schräg angeschnitten. Durch eine zweimalige Katheterisierung mit Venenverweilkathetern (Terumo Surflow®, Terumo Europe, Leuven, Belgien) in aufsteigender Grösse von 20G und 18G wurde die *A. ovarica* vorgedehnt bis die Applikation eines Katheters mit einem Lumen von 16G (Vygonüle T, Vygon, Écouen, Frankreich) möglich war. Der Katheter wurde mit zwei zirkulären Ligaturen um Arterie und Katheter in seiner Position fixiert (Polysorb 0®; Abb. 6).

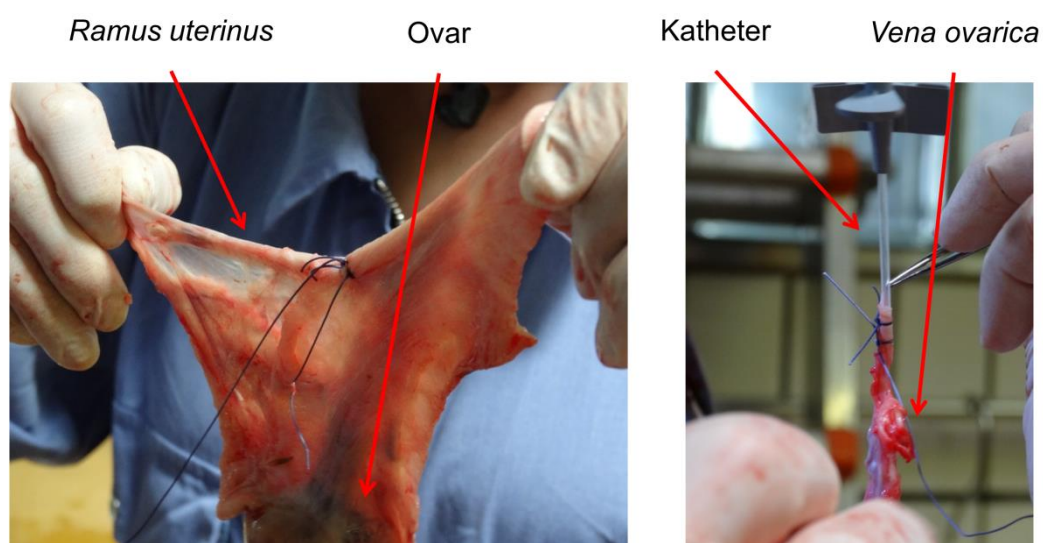


Abb. 5: Ligatur des *Ramus uterinus*

Abb. 6: *Arteria ovarica* mit fixiertem Katheter

Unmittelbar nach der Katheterisierung wurden die Ovarien mit auf 4 °C gekühltem, heparinisiertem (150 I.E. Heparin/ml Medium; Heparin „Bichsel“ 5000 I.E./ml®, Bichsel AG, Interlaken, Schweiz) Perfusionsmedium (Zusammensetzung siehe unten) gespült. Es wurde so lange gespült, bis das abfliessende Perfusat klar und das CL makroskopisch blutleer war. Dadurch sollte die Bildung von Blutgerinnseln in den kleinen Gefässen verhindert werden.



Abb. 7 (links). Ovar zu Beginn der Spülung (das Corpus luteum erscheint noch blutgefüllt)

Abb. 8 (oben). Blutleeres Corpus luteum nach der Spülung mit heparinisiertem Perfusionsmedium

Die Ovarien wurden in Bechergläsern, welche mit gekühltem heparinisiertem Perfusionsmedium gefüllt- und in Eis eingebettet waren, ins Organlabor am Tierspital Zürich transportiert.

2.3. Perfusion im Laboratorium

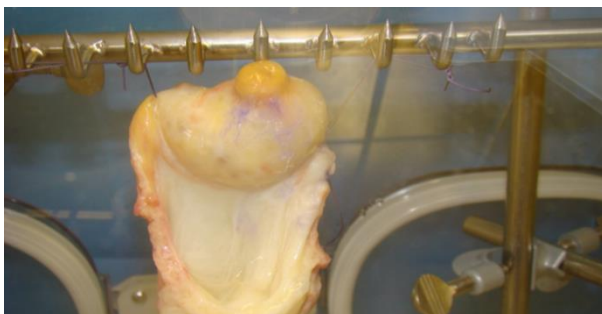


Abb. 9. Ovar mit Haltefäden an einem Stativ befestigt

Im Laboratorium wurde ultrasonographisch die Grösse des CL bestimmt (Aquila Esaote Pie Medical®, Esaote Biomedica, Köln, Deutschland). Das wichtigste Einschlusskriterium war das

Vorhandensein eines CL mit einem mittleren Durchmesser von >2 cm. An der *Extremitas tubaria* und an der *Extremitas uterina* wurden Haltefäden (Polysorb 0®) befestigt (Abb. 9), an welchen das Ovar an einer Stativstange so aufgehängt wurde, dass der *Margo liber* des Ovars oben und der *Margo mesovaricus* mit der katheterisierten Arterie und der frei auslaufenden Vene unten über einem Sammeltrichter positioniert waren. Das Stativ stand in einem Brutkasten für menschliche Neonaten (Atom Infant Incubator V-850®, Atom Medical Corporation, Tokio, Japan), um eine Perfusion unter standardisierten mikroklimatischen Bedingungen ($37.5 - 38.5$ °C; 75 - 85% relative Luftfeuchtigkeit) zu gewährleisten (Abb. 10).

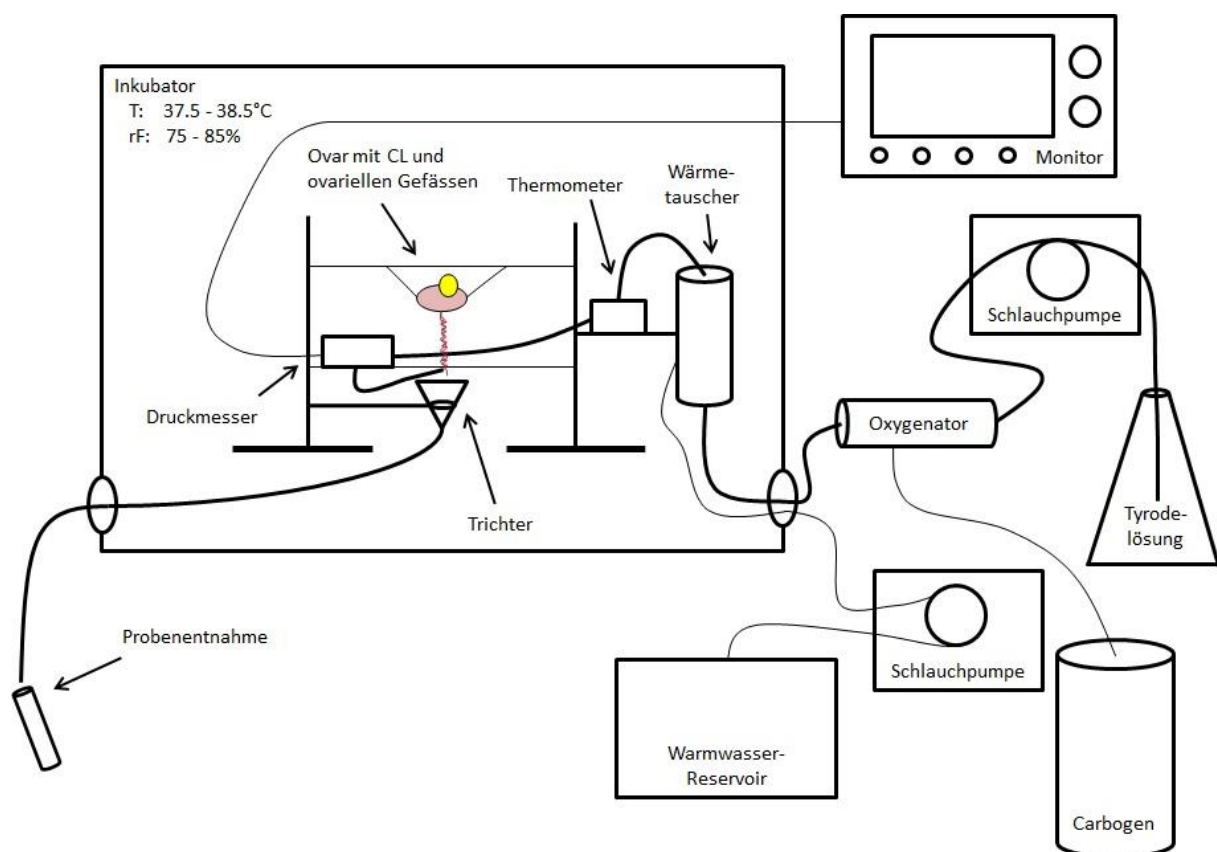


Abb. 10. Schematische Darstellung des Equipments für die isolierte Perfusion boviner Ovarien, welches optimale Bedingungen für ein standardisiertes Verfahren ermöglicht

Als Perfusionsmedium wurde Tyrode nach folgender Rezeptur verwendet:

NaCl 136 mM, NaHCO_3 11.9 mM, D(+)Glukose $\times \text{H}_2\text{O}$ 5.5 mM, KCL 2 mM, $\text{CaCl}_2 \times 2\text{H}_2\text{O}$ 1.8 mM, $\text{MgCl}_2 \times 6\text{H}_2\text{O}$ 1.05 mM, NaH_2PO_4 0.416 mM, und 6% Dextran

70 000 ad 1l destilliertes Wasser. Das osmotisch aktive Dextran 70 000 wurde zugesetzt, um die interzelluläre Ödematisierung, wie in früheren Studien (Janson *et al.* 1978, Bjersing *et al.* 1981) empfohlen, zu verringern.

Die Tyrode wurde mittels eines Hohlfaseroxygenators (Membrana Oxyphan PP50/200®, Membrana GmbH, Wuppertal, Deutschland) mit Carbogen (Oxycarbon medicinal, PanGas, Dagmersellen, Schweiz) oxygeniert. Dabei fließt das Perfusionsmedium im Oxygenator durch die Hohlfasern, welche wiederum in einer mit Carbogen durchfluteten Kammer hängen (Abb. 11 und 12). Um die Qualität der

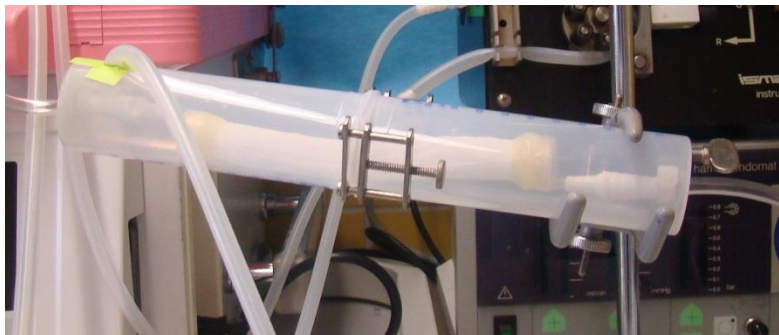


Abb. 11. Hohlfaseroxygenator, bei dem das Perfusionsmedium durch Hohlfasern in einer mit Gas durchfluteten Kammer fließt

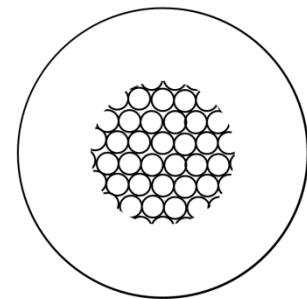


Abb. 12. Querschnittsschema des Hohlfaseroxygenators

Oxygenierung zu kontrollieren, wurden 10 min nach Beginn der Perfusion und danach alle 30 min bis zum Ende der Perfusion im Medium vor und nach der Ovarpassage mit dem Blutgasanalysegerät Rapidlap 248 TM (Siemens, München, Deutschland) der pH und die Partialdrücke von Sauerstoff und Kohlendioxid gemessen. Anhand dieser Messungen wurden die Zuführung von Carbogen und die Flussrate der Tyrode laufend angepasst, um einen physiologischen pH zu erreichen (Sollwert 7.40). Die Temperierung der Tyrode erfolgte mit einem Liebig Kühler (GB Kühler Liebig, NSK+H14/23 120 mm®, Glasbläserei Universität Zürich, Schweiz), welcher an einen Warmwasserkreislauf angeschlossen war (Typ SS B4®, Grant Instruments, Cambridge, England). Die Temperatur der Tyrodelösung wurde zwischen 0 und 20 min nach dem Beginn der Perfusion alle 5 min und danach bis zum Ende der Perfusion alle 10 min mit einem Thermometer (WDT, Garbsen,

Deutschland) direkt vor Eintritt in die *A. ovarica* gemessen. Anhand dieser Messungen wurde die Temperatur des Warmwasserkreislaufes so angepasst, dass die Temperatur der Tyrode, wie in älteren Studien (Koos *et al.* 1984, Brannstrom & Flaherty 1995) beschrieben, zwischen 37°C und 38°C gehalten wurde.

Zur Perfusion wurde eine druck- und volumengesteuerte Schlauchpumpe (Storz hamou Endomat®, Karl Storz GmbH, Tuttlingen, Deutschland) verwendet. Der Fluss wurde manuell mittels Messkolben und Stoppuhr nach 15 und 40 min und dann alle 30 min ermittelt und dokumentiert. Der Druck wurde mit einem Gerät zur invasiven Blutdruckmessung (Datex-Ohmeda Cardiocap 5®, GE Healthcare Systems, Little Chalfont, England) kontinuierlich überwacht und aufgezeichnet. Wie in einer älteren Studie vorgeschlagen (Stahler & Huch 1971), wurde der Druck so angepasst, dass eine Flussrate von ungefähr 2 ml/min pro Gramm Ovargewebe erreicht wurde. Um Verfälschungen durch eine Akkumulation von Metaboliten oder Hormonen zu vermeiden, wurde die Tyrode nicht rezykliert.

Vor und nach der Perfusion wurden ausserdem die Ovarien samt Mesovar gewogen (PM 400®, Mettler-Toledo, Greifensee, Schweiz), um das Ausmass der perfusionsbedingten Ödematisierung abzuschätzen.

Die Ovarien beider Gruppen wurden während 240 min perfundiert, wobei die ersten 60 min als Äquilibrationsphase gewertet wurden. Eine halbe Stunde vor Perfusionsende wurden die Ovarien mit 500 I.E. humanem Choriongonadotropin (hCG; Chorulon 1500®, MSD Animal Health GmbH, Luzern, Schweiz) behandelt. Ein hCG-induzierter Anstieg der P₄-Freisetzung wurde als Indikator für eine ungestörte Funktionalität der Lutealzellen interpretiert.

Nach Beendigung der Perfusion wurden die Ovarien mit angefärbtem Perfusionsmedium (Patentblau, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) perfundiert, um Lecks zu entdecken, die bei der Perfusion mit klarem Perfusionsmedium nicht sichtbar

gewesen waren. In einem weiteren Schritt wurden die Corpora lutea in der Medianen angeschnitten und makroskopisch auf eine homogene Anfärbung mit Patentblau überprüft. Ovarien, bei denen entweder mehr als etwa ein Viertel des Perfusats bereits vor dem Eintritt in das Ovar aus einem Leck der *A. ovarica* wieder austrat, oder bei denen das CL nur schwach oder inhomogen angefärbt wurde, wurden retrospektiv aus der Studie ausgeschlossen.

Nach jeder Ovarperfusion wurden die gesamte Glasware und alle Schläuche, welche direkten Kontakt mit dem Perfusionsmedium hatten, gereinigt und dampfsterilisiert.

2.4. Behandlungsgruppen

Die Ovarien wurden zwei Gruppen zugeteilt. Nach Ablauf der einstündigen Äquilibrationsphase wurde eine Gruppe von Ovarien ohne Behandlung als Kontrolle für weitere drei Stunden perfundiert (GK, n=8). Bei der anderen Gruppe wurde dem Perfusionsmedium nach Ablauf der Äquilibrationsphase LPS von *E. coli* O55:B5 (LPS O55:B5, lyophilisiertes Pulver, Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA) in einer Konzentration von 0.5 µg/ml Perfusat zugesetzt (GLPS, n=8). Diese Konzentration wurde gewählt, da im Blutplasma von Kühen mit einer toxischen Mastitis LPS-Konzentrationen von etwa 0.5 µg/ml gemessen wurden (Auskunft von Prof. A. Miyamoto, Obihiro University of Agriculture and Veterinary Medicine, Japan).

2.5. Bestimmung von Glukose, Laktat, LDH, CK, P₄ und PGF_{2α}

Das arterielle Perfusat wurde vor Beginn der Perfusion und nach Perfusionsdauern von 60, 120 und 180 min beprobt. Während der gesamten Perfusionsdauer wurden vom abfließenden Perfusat alle zehn Minuten Proben entnommen. Pro Zeitpunkt wurden jeweils drei Aliquots nativ belassen und ein Aliquot für die Glukosebestimmung fluoridiert (Vacuette FX Sodium Fluoride / Potassium Oxalate, Greiner

bio-one, Kremsmünster, Austria) und bis zur weiteren Analyse bei $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ (P_4) respektive $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ (Glukose, Laktat, LDH, CK, $\text{PGF}_{2\alpha}$) aufbewahrt.

Im arteriellen Perfusat wurde zu allen Zeitpunkten der Probenentnahme die Glukosekonzentration gemessen. Im venösen Perfusat wurden nach 10 min und dann alle 30 min bis zum Ende der Perfusion die Konzentrationen von Glukose und Laktat und die Aktivitäten von LDH und CK ermittelt. Die Bestimmungen von Glukose, Laktat, LDH und CK wurden durch das Labor der Veterinärphysiologie (Vetsuisse Fakultät, Universität Bern) durchgeführt. Es wurden die Kits Glucose RTU®, Lactate PAP®, Enzyline LDH NAC® und Enzyline CK NAC® (Biomérieux, Lyon, Frankreich) für das Analysegerät Cobas Mira S® (Roche, Basel, Schweiz) verwendet.

Die Konzentration von P_4 im venösen Perfusat wurde während der gesamten Perfusionsdauer in 10 min-Intervallen gemessen. Die Analysen wurden ebenfalls durch das Labor der Veterinärphysiologie (Vetsuisse Fakultät, Universität Bern) durchgeführt, wobei der P_4 Radioimmunoassay (RIA) Kit IM1188 (Beckman Coulter GmbH, Krefeld, Deutschland) verwendet wurde.

Die Konzentration von $\text{PGF}_{2\alpha}$ wurde in der nativen Tyrode, sowie im venösen Perfusat nach 0, 10, 40, 70, 100, 130, 160, 190, 220 und 240 min gemessen. Die Analysen wurden an der ETH Zürich (Tierphysiologie, Institut für Agrarwissenschaften) durchgeführt, wobei ein High Sensitivity $\text{PGF}_{2\alpha}$ ELISA Kit verwendet wurde (Enzo Life Sciences AG, Lausen, Schweiz).

2.6. Expressionsanalyse

Nach 60, 120, 180 und 240 min Perfusionsdauer wurde mit einer Biopsiekanüle (TEMNO Evolution™; Fa. Walter, Baruth/Mark, Deutschland), die vorher mittels RNase-ExitusPlus™ (AppliChem, Darmstadt, Deutschland) von RNase befreit wurde,

jeweils ein Stanzbiopat (ungefähr 15 x 1 x 1 mm) im Bereich des maximalen Durchmessers des CL entnommen, so dass sowohl Zellen der Peripherie als auch des Zentrums enthalten waren. Nach Entnahme der jeweiligen Biopate wurden die entstandenen Defekte der CL-Oberfläche mit Gewebekleber (Histoacryl®, B. Braun Melsungen AG, Melsungen, Deutschland) wieder verschlossen. Die Biopate wurden in sterilen DNase- und RNase-freien Kryoröhrchen (Fa. Brand, Wertheim, Deutschland) in einem Dry Shipper (Taylor-Wharton CX100, Jenson Scientific, Franklin, USA) mit flüssigem Stickstoff tiefgefroren und bei -80 °C bis zur weiteren Analyse aufbewahrt.

Bei der Analyse der CL-Biopate wurden die relativen mRNA Expressionen von LH / CG Rezeptor (*LHCGR*), *STAR*, *HSD3B*, *TLR2* und *-4*, *CASP3*, *-8*, und *-9*, *PGES/PTGES*, *PGFS/AKR1B1*, PGF Rezeptor (*PTGFR/FP*), *TNFα*, VEGFA Isoform 121 (*VEGFA₁₂₁*), *FGF2*, und *EDN1* bestimmt. Für die Analyse wurde die gesamte RNA der lutealen Gewebeproben extrahiert und, wie bereits beschrieben (Ulbrich *et al.* 2009), revers transkribiert. Die mRNA Expression wurde in einer zweistufigen quantitativen real-time RT-PCR (qPCR) an der ETH Zürich (Tierphysiologie, Institut für Agrarwissenschaften, Schweiz) bestimmt. Zur Durchführung der PCR wurden das CFX384 Real-Time PCR Analysegerät (Bio-Rad, München, Deutschland) und das SsoFast EvaGreen Supermix (Bio-Rad, München, Deutschland) verwendet. Die qPCR wurde in einem Reaktionsvolumen von 10 µl durchgeführt, welches aus 5 µl EvaGreen Mix, 0.4 µl jedes Primers (10 µM), 0.07 µl VisiBlue (TATAA Biocenter, Göteborg, Sweden), 3.13 µl Wasser und 1 µl cDNA zusammengesetzt war. Die Primer, welche zur Amplifikation spezifischer Fragmente der ausgewählten Gene verwendet wurden, sind in Tabelle 1 aufgeführt. Die Annealing-Temperaturen (AT) und die Schmelzpunkte (SP) sind aufgeführt. Die Anzahl der Zyklen (C_q), welche benötigt wurden, um ein bestimmtes SYBR Green Fluoreszenzsignal zu erhalten,

wurden mit der Regressionsmethode berechnet (Bio-Rad CFX Manager 3.1). Die C_q war umgekehrt proportional zum Logarithmus der initialen Matrizenkonzentration. Die C_q , welche für die Zielsequenzen bestimmt wurde, wurde gegen das geometrische Mittel der fünf Referenzgene YWHAZ, H3F3A, CNOT11, SUZ12 UND TBP normalisiert (ΔC_q). Um das Auftreten negativer Vorzeichen zu vermeiden und gleichzeitig einen relativen Vergleich zwischen zwei Genen zu ermöglichen, wurden ein willkürlicher Zahlenwert von 20 zu den als Mittelwert (MW) \pm SEM dargestellten Ergebnissen addiert (ΔC_q). Ein hohes ΔC_q entspricht somit einer hohen Transkriptmenge des entsprechenden Gens (Livak & Schmittgen 2001).

2.7. Statistische Analyse

Es wurden nur Daten von 11 Ovarien verwendet. Die Ergebnisse von fünf Ovarien (zwei der Kontrollgruppe und drei der LPS-Gruppe), bei denen Lecks in der *A. ovarica* aufgetreten und das CL dadurch inhomogen perfundiert worden war, wurden nicht verwendet. Bei den ausgeschlossenen Ovarien sank der Druck während der Äquilibrationsphase schwächer ab ($p = 0.03$) als bei den verwendeten Ovarien (22.8 ± 10.3 vs. 44.8 ± 4.2 mmHg). Vermutlich kam es bei den nicht verwendeten Ovarien vermehrt zur Bildung von intravasalen Koagula, was einen erhöhten Gefäßwiderstand zur Folge hatte. Die mittlere P_4 -Konzentration über die gesamte Perfusionszeit war bei den ausgeschlossenen Ovarien (68.0 ± 6.4 ng/ml) tiefer ($p < 0.0001$) als bei den verwendeten (252.9 ± 23.5 ng/ml). Die Verteilung der Daten wurde visuell (PROC CHART) und mittels Shapiro-Wilk-Test (PROC UNIVARIATE) auf Normalverteilung überprüft.

Tab. 1. Untersuchte Gene des bovinen Corpus luteum mit den Akzessionsnummern und Sequenzen der PCR-Primer, sowie der Länge, den Annealing-Temperaturen (AT) und den Schmelzpunkten (SP) der PCR-Produkte.

Gen	Gensymbol	Referenz	Vorwärtsprimer	Rückwärtsprimer	PCR- Produkt	AT	SP
		[Akz. Nr.]	[5'-...-3']	[5'-...-3']	[bp]	[°C]	[°C]
Tyrosine 3-monooxygenase/tryptophan 5-monooxygenase activation protein, zeta	YWHAZ	NM_174814.2	AGGCTGAGCGATATGATGAC	GACCCTCCAAGATGACCTAC	141	60	81
Histone	H3F3A	NM_001014389.2	ACTGGCTACAAAAGCCGCTC	ACTTGCCTCCTGCAAAGCAC	233	60	85
CCR4-NOT transcription complex, subunit 11	CNOT11	XM_582695.6	TCAGTGGACCAAAGCCACCTA	CTCCACACCGGTGCTGTTCT	170	60	87
Suppressor of zeste 12 homolog (Drosophila)	SUZ12	NM_001205587.1	CATCCAAAAGGTGCTAGGATAGATG	TGGGCCTGCACACAAGAATG	160	60	82
TATA box bindung protein	TBP	NM_001075742.1	CAGAGAGCTCCGGGATCGT	CACCATCTCCCAGAACTGAATAT	194	60	83
Luteinisierendes Hormon / Choriogonadotropin Rezeptor	LHCGR	NM_174381.1	GGAAATGGATTGAAGAAATACAA	GTGCTTTCACATTGTTTGAAAAG	376	60	85
Steroidogenic acute regulatory protein	STAR	NM_174189.2	GGATTAACCAGGTTGCGCG	CTCTCCTTCTCCAGCCCTC	157	60	89
3 β -hydroxysteroid Dehydrogenase	HSD3B	NM_174343.3	TACCCAGCTGCTGTTGGA	ATGCCGTTGTTATTCAAGGC	322	60	87

Toll-like Receptor 2	TLR2	NM_174197.2	CCATGTGGAGAGGGTGTT	GGGGACACAAAACAGCACTT	138	60	81
Toll-like Receptor 4	TLR4	NM_174198.6	GACCCCTTGCGTACAGGTTGT	GGTCCAGCATCTTGGTTGAT	103	60	80
Caspase 3	CASP3	NM_001077840.1	AACCTCCGTGGATTCAAATC	TTCAGGRTAATCCATTTGTAAC	114	60	80
Caspase 8	CASP8	NM_001045970.2	TGTCACAATCGCTTCCAGAG	GAAGTTCAGGCACCTGCTTC	183	60	83
Caspase 9	CASP9	NM_001205504.1	GTGGTGGAGAGCAGAAAGAC	AAACTAGACACGGCATCTGG	145	60	86
Prostaglandin E Synthase	PGES (PTGES)	NM_174443.2	TCCTGGTCTTCTTCCTGGG	CCCAGACAATCTGCAGGG	132	60	88
Prostaglandin F Synthase	PGFS (AKR1B1)	NM_001012519.1	ATACAAGCCGGCGGTTAAC	TGTCTGCAATCGCTTTGATC	188	60	86
Prostaglandin F Receptor	PTGFR (FP)	NM_181025.3	AGCCTTGCCATTGCTATCC	TAGTTCCATTGATGAGGTGCC	127	60	80
Tumornekrosefaktor α	TNF α	NM_173966.3	CCACGTTGTAGCCGACATC	ACCACCAGCTGGTTGTCTTC	108	60	86
Vascular endothelial growth factor A Isoform 121	VEGFA ₁₂₁	NM_174216	CCGTCCCATTGAGACCCTG	CGGCTTGTCACAATTTTCTTGTC	280	60	87
Fibroblast growth factor 2 (basic)	FGF2	NM_174056.3	GAACGGGGGCTTCTTCCT	CCCAGTTCGTTTCAGTGCC	288	60	81
Endothelin 1	EDN1	NM_181010.2	CTCTTCCCTGATGGATAAAGAGTG	GAACAACGTGCTCTGGAGTG	80	60	79

Das Messverfahren der CK hatte ein unteres Detektionslimit von 5 U/l. Bei Messwerten unter diesem Grenzwert wurde der Wert von 4 U/l zur weiteren statistischen Analyse verwendet.

Da die Daten normalverteilt waren, wurden sie mit dem Student's t-test (PROC TTEST) unter Berücksichtigung von Messwiederholungen auf Unterschiede zwischen den Gruppen getestet. Alle statistischen Analysen wurden mit dem Statistical Analysis System V9.1 (SAS Institute Inc., NC, USA) durchgeführt. Eine Irrtumswahrscheinlichkeit von $p \leq 0.05$ wurde als signifikant beurteilt.

3. Ergebnisse

3.1. Perfusionsanalyse

Die durchschnittliche Zeitdauer zwischen der Entblutung der Kuh und dem Beginn der isolierten Perfusion betrug 79.1 ± 3.2 min (MW \pm SEM; Range, 65 - 90 min). Die Länge dieser ischämischen Phase unterschied sich nicht ($p > 0.05$) zwischen den Ovarien der Kontroll- (77.5 ± 4.6 min) und denen der LPS-Gruppe (81.0 ± 4.6 min). Der ultrasonographisch ermittelte Durchmesser des CL wies keinen Unterschied ($p > 0.05$) zwischen den Kontroll ovarien (27.8 ± 1.4 mm) und den mit LPS behandelten Ovarien auf (27.5 ± 0.7 mm).

Der Druck in der *A. ovarica* fiel während der Äquilibrationsphase (0 - 60 min nach Beginn der Perfusion) in der Kontroll- (42.1 ± 5.7 mmHg) und LPS-Gruppe (47.9 ± 6.6 mmHg) gleich stark ab ($p > 0.05$). Während der Behandlungsphase (60 - 240 min nach Beginn der Perfusion) erfolgten in beiden Gruppen keine Änderungen des Druckes ($p > 0.05$).

Die mittlere Temperatur des Perfusionsmediums bei allen Ovarien betrug 37.9 ± 0.1 °C (37.5 - 38.3 °C) und der mittlere Fluss 37.7 ± 1.4 ml/min (29.3 - 44.5 ml/min). Während der Behandlungsphase gab es keine Unterschiede in der Temperatur (38.2 ± 0.1 vs. 38.2 ± 0.1 °C) und im Fluss (38.0 ± 2.8 vs. 36.5 ± 1.3 ml/min) des Perfusionsmediums zwischen der Kontroll- und der LPS-Gruppe ($p > 0.05$).

Bei fünf Ovarien jeder Gruppe begann sich das Mesovar nach einer vergleichbaren ($p > 0.05$) Perfusionsdauer von 11.0 ± 1.0 min (Kontrollgruppe) respektive 12.0 ± 2.6 min (LPS-Gruppe) regelmässig zu kontrahieren, wobei die Gesamtdauer der Kontraktionen in der Kontroll- (227.0 ± 2.0 min) und der LPS-Gruppe (228.0 ± 2.6 min) ebenfalls keinen Unterschied aufwies ($p > 0.05$). Während der

letzten Stunde der Perfusion konnte in vier Ovarien der LPS-Gruppe eine (nicht näher quantifizierte) Intensivierung der Kontraktionen bis hin zur Ausprägung tetanischer Kontraktionen beobachtet werden, wohingegen die Kontraktionen in der Kontrollgruppe an Intensität verloren.

In beiden Gruppen kam es im Mesovar während der Perfusion zu einer Ödematisierung, welche eine Gewichtszunahme von Ovar und Mesovar zur Folge hatte. Deren Ausmass unterschied sich nicht ($p > 0.05$) zwischen der Kontroll- (30.3 ± 7.2 g) und der LPS-Gruppe (47.2 ± 8.6 g).

Der mittlere Glukoseverbrauch über die Perfusionszeit war bei den Kontroll ovarien (0.2 ± 0.1 mmol/l) und den mit LPS behandelten Ovarien (0.2 ± 0.02 mmol/l) gleich gross ($p > 0.05$). Bei gesonderter Betrachtung der einzelnen Untersuchungszeitpunkte konnte nur 180 min nach Beginn der LPS-Behandlung ein höherer Glukoseverbrauch in der LPS-Gruppe als in der Kontrollgruppe beobachtet werden ($p = 0.03$; Abb. 13).

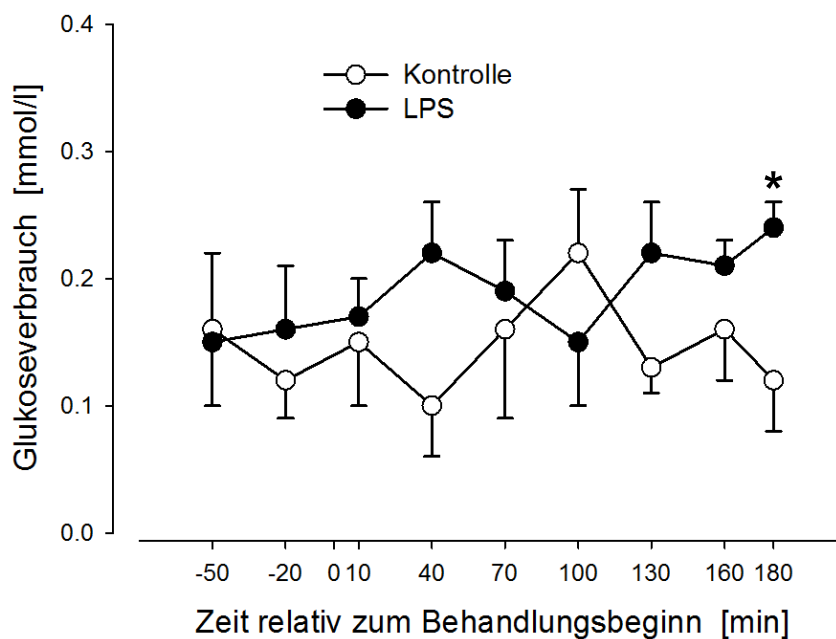


Abb. 13. Veränderungen (MW \pm SEM) im Glukoseverbrauch bei den Kontroll- (n=6) und den mit LPS behandelten Ovarien (n=5) während der Äquilibrations- und Behandlungsphase der Perfusion.

* Unterschied zwischen den beiden Gruppen ($p \leq 0.05$) zu dem betreffenden Zeitpunkt.

Die durchschnittliche Laktatproduktion über die gesamte Perfusionszeit unterschied sich nicht ($p > 0.05$) zwischen den Ovarien der Kontroll- (0.2 ± 0.04 mmol/l) und der LPS-Gruppe (0.2 ± 0.02 mmol/l). Bei Betrachtung der einzelnen Untersuchungszeitpunkte waren die Laktatkonzentrationen 70 ($p = 0.01$) und 100 min ($p = 0.03$) nach Beginn der Behandlung in der LPS-Gruppe höher als in der Kontrollgruppe (Abb. 14).

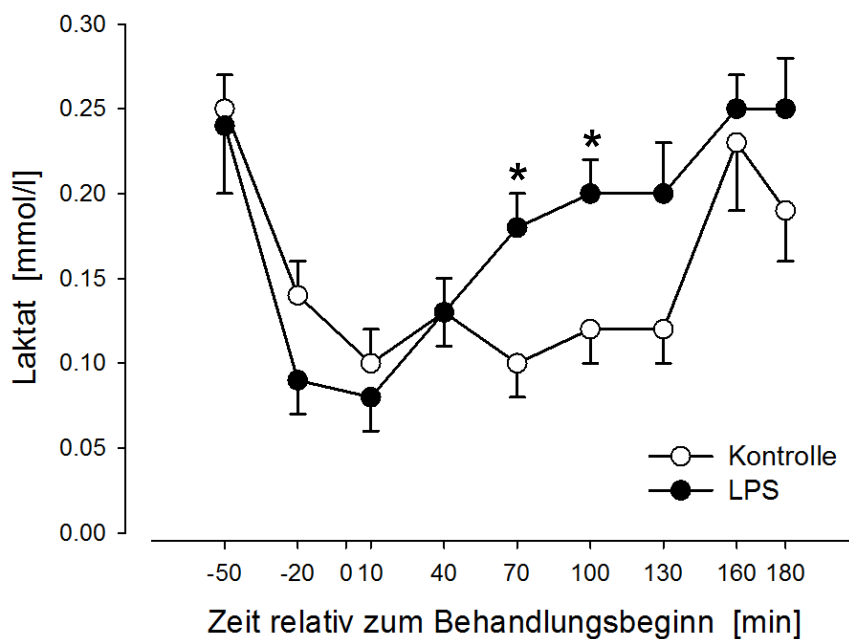


Abb. 14. Veränderungen (MW \pm SEM) in der Laktatkonzentration bei den Kontroll- ($n=6$) und den mit LPS behandelten Ovarien ($n=5$) während der Äquilibrations- und Behandlungsphase der Perfusion. * Unterschiede zwischen den beiden Gruppen ($p \leq 0.05$) zu den betreffenden Zeitpunkten.

Die mittleren Enzymaktivitäten von LDH und CK sanken während der Äquilibrationsphase fast bis auf die Hälfte der initialen Werte ab ($P < 0.05$) und blieben danach relativ konstant. Über die gesamte Perfusionsdauer gab es weder in der LDH- (12.3 ± 6.1 vs. 7.3 ± 2.6 U/l) noch in der CK-Aktivität (11.7 ± 2.3 vs. 9.8 ± 1.1 U/l) Unterschiede zwischen den beiden Gruppen ($p > 0.05$). Auch zu den einzelnen Untersuchungszeitpunkten unterschieden sich die Enzymaktivitäten beider Gruppen nicht ($p > 0.05$; Abb. 15 und 16).

Zusammengefasst zeigte sich, dass sich die genannten Parameter, welche die Perfusionserfordernisse charakterisieren, zu Beginn der Behandlungsphase (nach der Äquilibration) in beiden Gruppen im physiologischen Bereich befanden.

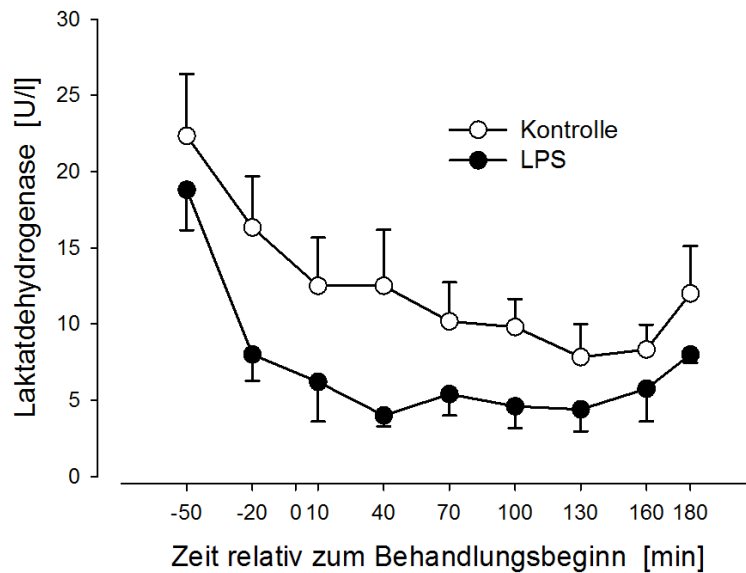


Abb. 15. Veränderungen (MW \pm SEM) in der Aktivität der Laktatdehydrogenase bei den Kontroll- (n=6) und den mit LPS behandelten Ovarien (n=5) während der Äquilierungs- und Behandlungsphase der Perfusion.

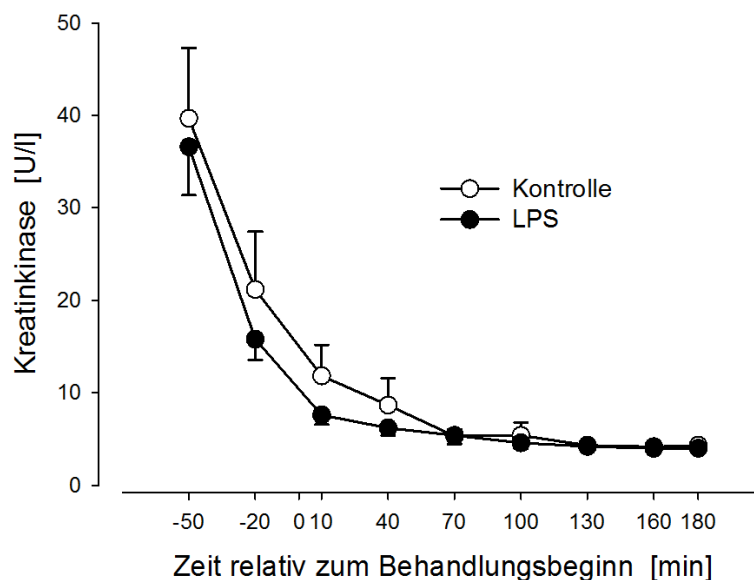


Abb. 16. Veränderungen (MW \pm SEM) in der Aktivität der Kreatinkinase bei den Kontroll- (n=6) und den mit LPS behandelten Ovarien (n=5) während der Äquilierungs- und Behandlungsphase der Perfusion.

3.2. Hormonanalyse

Die P₄-Konzentrationen im abfließenden Perfusat blieben während der ersten 150 min der LPS-Behandlung konstant (MW ± SEM; 223.2 ± 41.3 ng/ml) und unterschieden sich nicht (p > 0.05) von denen der Kontrollgruppe (268.5 ± 35.0 ng/ml). Nach der hCG-Gabe (150 min nach Beginn der LPS-Behandlung), stiegen die P₄-Konzentrationen jedoch nur in der Kontrollgruppe an und erreichten 30 min später höhere Konzentrationen (p = 0.04) in der Kontroll- (402.4 ± 39.9 ng/ml) als in der LPS-Gruppe (241.9 ± 56.8 ng/ml; Abb. 17).

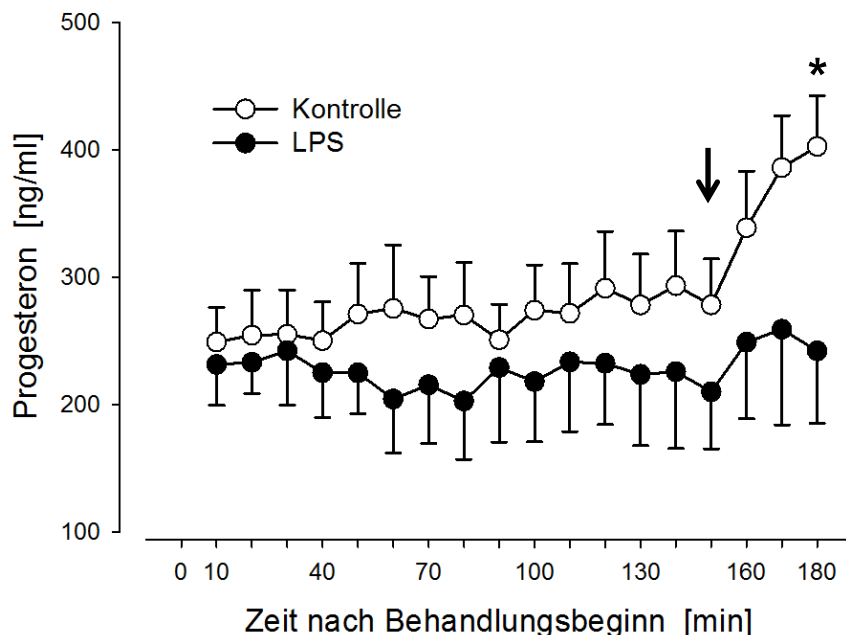


Abb. 17. Veränderungen (MW ± SEM) in der Progesteronkonzentration im abfließenden Perfusat bei den Kontroll- (n=6) und den mit LPS behandelten Ovarien (n=5) während der Behandlungsphase der Perfusion.

↓ indexiert die Verabreichung von 500 I.E. hCG.

* Unterschied zwischen den beiden Gruppen (p ≤ 0.05) zu dem betreffenden Zeitpunkt.

Die durchschnittliche PGF_{2α}-Konzentration über die gesamte Behandlungsdauer unterschied sich nicht (p > 0.05) zwischen der Kontroll- (22.8 ± 6.9 pg/ml) und der LPS-Gruppe (53.0 ± 18.5 pg/ml). Es waren auch bezüglich der einzelnen Untersuchungszeitpunkte keine Unterschiede zwischen den beiden Gruppen vorhanden (Abb. 18).

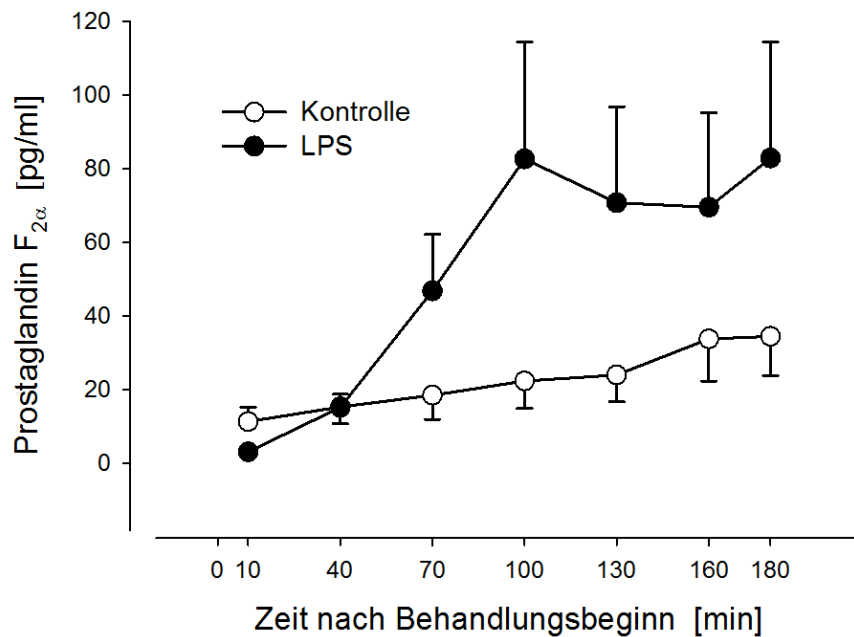


Abb. 18. Veränderungen (MW \pm SEM) in der Prostaglandin F_{2α}-Konzentration im abfließenden Perfusat bei den Kontroll- (n=6) und den mit LPS behandelten Ovarien (n=5) während der Behandlungsphase der Perfusion.

3.3. Expressionsanalyse

Die luteale mRNA Expression der steroidogenen Faktoren *STAR* und *HSD3B* unterschied sich zu keinem Untersuchungszeitpunkt ($p > 0.05$) zwischen der Kontroll- und der LPS-Gruppe (Abb. 19). Bei der Expression von *LHCGR* gab es ebenfalls zu keinem Zeitpunkt Unterscheide zwischen den beiden Gruppen ($p > 0.05$; Abb. 19).

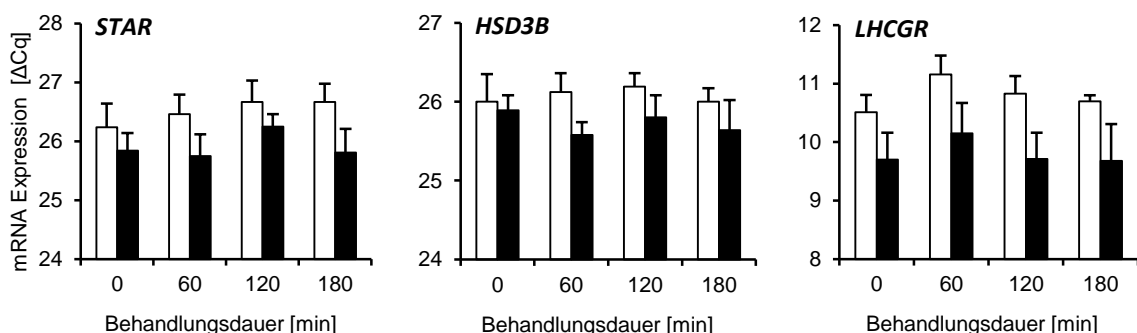


Abb. 19. Luteale mRNA Expressionen (MW \pm SEM) von Steroidogenic acute regulatory protein (*STAR*), 3 β -hydroxysteroid Dehydrogenase (*HSD3B*) und Luteinisierendem Hormon / Choriongonadotropin Rezeptor (*LHCGR*) in den Kontroll- (weisse Säulen; n=6) und den mit LPS behandelten Ovarien (schwarze Säulen; n=5) während der Behandlungsphase der Perfusion.

Die mRNA Expression von *TNFα* war jedoch in der LPS-Gruppe sowohl 60 ($p = 0.0002$) als auch 120 min ($p = 0.004$) nach Behandlungsbeginn höher als in der Kontrollgruppe (Abb. 20). Ausserdem war die Expression von *TLR2* 180 min nach Behandlungsbeginn in der LPS-Gruppe höher als in der Kontrollgruppe ($p = 0.03$), während sich die Expression von *TLR4* zu keinem Untersuchungszeitpunkt zwischen den beiden Gruppen unterschied ($p > 0.05$; Abb. 20).

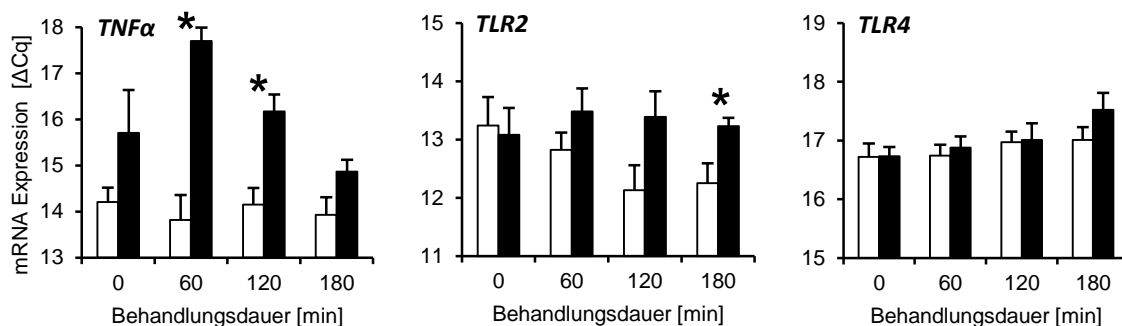


Abb. 20. Luteale mRNA Expressionen (MW \pm SEM) von Tumornekrosefaktor α (*TNFα*) und den Toll-like Rezeptoren 2 (*TLR2*) und -4 (*TLR4*) in den Kontroll- (weisse Säulen; $n=6$) und den mit LPS behandelten Ovarien (schwarze Säulen; $n=5$) während der Behandlungsphase der Perfusion.

* Unterschiede zwischen den beiden Gruppen ($p \leq 0.05$) zu den betreffenden Zeitpunkten.

Die Analyse der proapoptotischen Faktoren zeigte 60 ($p = 0.02$), 120 ($p < 0.0001$) und 180 min ($p < 0.0001$) nach Behandlungsbeginn eine höhere luteale mRNA Expression von *CASP3* in den mit LPS behandelten Ovarien als in den Kontroll-ovarien (Abb. 21). Während die *CASP8* 60 ($p = 0.05$) und 180 min ($p = 0.01$) nach der LPS-Behandlung stärker exprimiert wurde, konnten bei der *CASP9* zu keinem Untersuchungszeitpunkt Unterschiede zwischen der Kontroll- und LPS-Gruppe festgestellt werden ($p > 0.05$; Abb. 21).

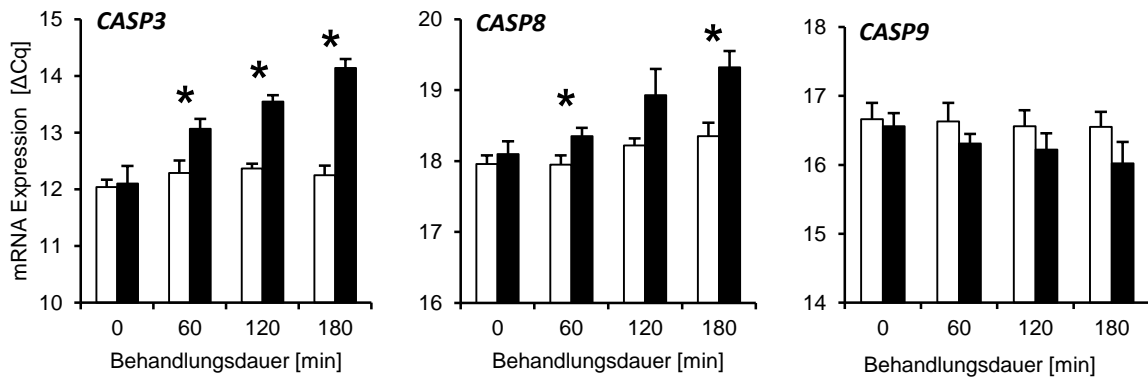


Abb. 21. Luteale mRNA Expressionen (MW \pm SEM) von Caspase 3 (CASP3), -8 (CASP8) und -9 (CASP9) in den Kontroll- (weisse Säulen; n=6) und den mit LPS behandelten Ovarien (schwarze Säulen; n=5) während der Behandlungsphase der Perfusion.

* Unterschiede zwischen den beiden Gruppen ($p \leq 0.05$) zu den betreffenden Zeitpunkten.

Während die mRNA Expressionen von *PGES* und *PGFS* in der LPS-Gruppe nach 120 ($p = 0.008$; nur *PGES*) und 180 min ($p = 0.03$ respektive $p = 0.05$) höher als in der Kontrollgruppe waren, gab es während der gesamten Behandlungsdauer keine Unterschiede zwischen den Gruppen in der Expression von *PTGFR* ($p > 0.05$; Abb. 22).

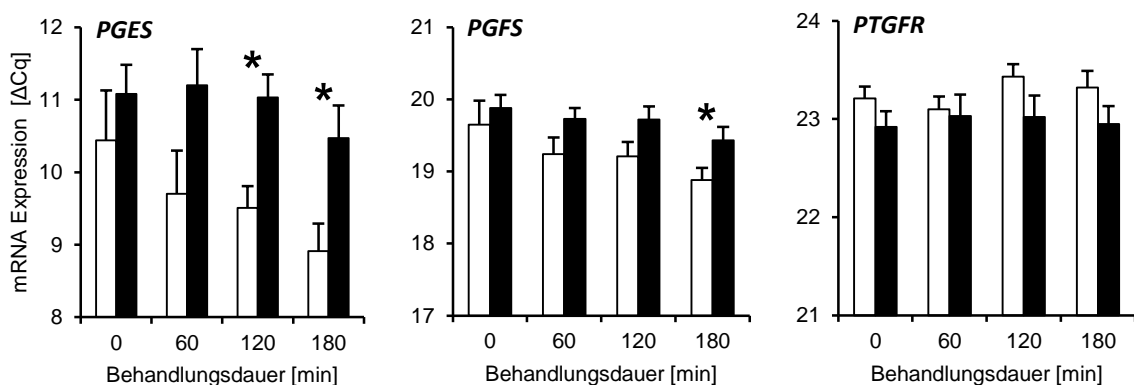


Abb. 22. Luteale mRNA Expressionen (MW \pm SEM) von Prostaglandin E- (*PGES*) und -F Synthase (*PGFS*), sowie vom Prostaglandin F Rezeptor (*PTGFR*) in den Kontroll- (weisse Säulen; n=6) und den mit LPS behandelten Ovarien (schwarze Säulen; n=5) während der Behandlungsphase der Perfusion.

* Unterschiede zwischen den beiden Gruppen ($p \leq 0.05$) zu den betreffenden Zeitpunkten.

Die luteale mRNA Expression des angiogenen Faktors *VEGFA*₁₂₁ war in der LPS Gruppe 60 min nach Behandlungsbeginn höher ($p = 0.05$) als in der Kontrollgruppe (Abb. 23). Im Gegensatz dazu unterschieden sich die Expressionen von *FGF2* und *EDN1* nicht ($p > 0.05$) zwischen der Kontroll- und der LPS-Gruppe (Abb. 23).

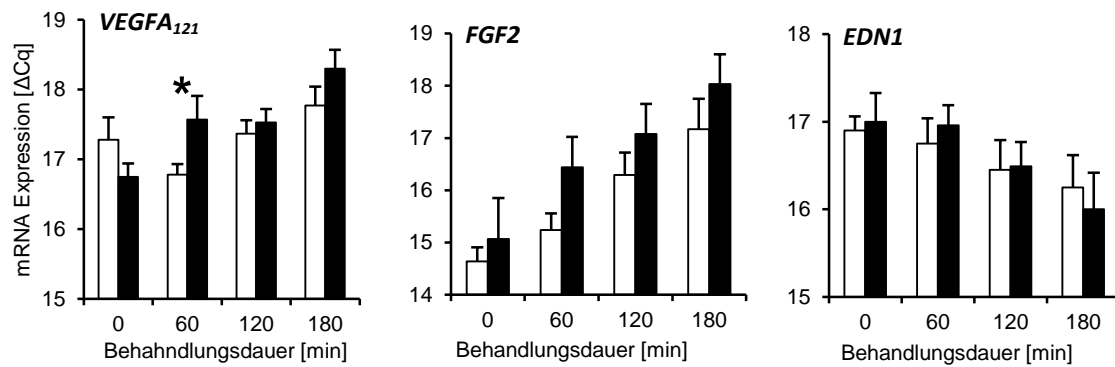


Abb. 23. Luteale mRNA Expressionen (MW ± SEM) von Vascular endothelial growth factor A Isoform 121 (*VEGFA*₁₂₁), Fibroblast growth factor 2 (*FGF2*) und Endothelin 1 (*EDN1*) in den Kontroll- (weisse Säulen; n=6) und den mit LPS behandelten Ovarien (schwarze Säulen; n=5) während der Behandlungsphase der Perfusion.

* Unterschied zwischen den beiden Gruppen ($p \leq 0.05$) zu dem betreffenden Zeitpunkt.

4. Diskussion

In der vorliegenden Studie wurde besonderes Augenmerk darauf gelegt, den Energiemetabolismus und die Vitalität der Ovarien während eines dreistündigen Intervalls nach der Äquilibration entsprechend der physiologischen Situation *in vivo* zu erhalten. Dafür wurde die ischämische Phase, die aufgrund reduzierten arteriellen oder venösen Blutflusses, Entleerung der zellulären Energievorräte oder Akkumulation toxischer Metaboliten zum Zelltod führt (Ingec *et al.* 2011), in der Studie möglichst kurz gehalten. Ausserdem wurden mittels Messung des Drucks in der *A. ovarica*, des Glukoseverbrauchs, der Laktatproduktion und der Aktivitäten von LDH und CK der Gefässwiderstand (arterieller Druck) sowie die adäquate Oxygenierung (Glukose, Laktat) und zytolytische Gewebeprozesse (LDH, CK) überwacht. Der arterielle Perfusionsdruck sank während der Äquilibrationsphase stark ab und blieb danach stabil, was auf eine Normalisierung des Gefässwiderstandes nach der Reperfusion schliessen lässt. Aufgrund des vergleichbaren Glukoseverbrauchs bei den Kontroll- und den mit LPS behandelten Ovarien kann ausserdem von einer ähnlichen metabolischen Aktivität der Ovarien beider Gruppen ausgegangen werden. In beiden Gruppen sanken die Laktatkonzentrationen unmittelbar nach dem Start der Perfusion stark ab. Die hohen Laktatkonzentrationen vor Perfusionsbeginn wurden wahrscheinlich durch die Hypoxie während des Transportes verursacht (Ahren *et al.* 1972) und die Reperfusion mit oxygeniertem Medium führte vor dem Beginn der Behandlungsphase zu einem Rückgang der Laktatproduktion bis auf physiologische Werte. In Übereinstimmung mit einer Studie an isoliert perfundierten menschlichen Uteri (Richter *et al.* 2000) sanken die hohen Konzentrationen an LDH und CK, als Indikatoren für einen Ischämie-bedingten Zelltod, innerhalb der Äquilibrationsphase auf niedrige und konstante Spiegel ab. Schlussfolgernd lagen in der vorliegenden Studie nach der Äquilibration relativ physiologische Bedingungen vor, sodass die

während der Behandlungsphase gewonnenen Ergebnisse eine hohe Verlässlichkeit aufweisen.

Die für eine stärkere metabolische Aktivität sprechende erhöhte Glukoseaufnahme in der LPS-Gruppe gegen Ende der Perfusion wurde vermutlich durch die verstärkten Kontraktionen des vaskulären Pedikels verursacht. In Übereinstimmung mit dieser Beobachtung wurden auch bei isoliert perfundierten Ovarien von Schafen rhythmische Kontraktionen des vaskulären Pedikels und des Ovarhilus in zwei bis dreiminütigen Intervallen beobachtet, wobei das vaskuläre Pedikel für einen nicht unwesentlichen Teil der Glukoseaufnahme verantwortlich war (Janson *et al.* 1978). Der Anstieg der Laktatproduktion 70 min nach Beginn der LPS-Behandlung und die höheren Werte in der LPS-Gruppe im Vergleich zur Kontrollgruppe weisen auf eine erhöhte metabolische Aktivität der mit LPS behandelten Ovarien hin. In Analogie zum Glukoseverbrauch wurde diese vermutlich teilweise durch vermehrte Kontraktionen des vaskulären Pedikels in der LPS Gruppe verursacht. Der in der LPS-Gruppe im Vergleich zur Kontrollgruppe früher erfolgende und stärker ausgeprägte Anstieg der Laktatkonzentration stimmt zudem mit Beobachtungen aus einer *in vivo* Studie überein, in der es nach einer intravenösen Dauertropfinfusion über 6 h mit 1.0 respektive 2.5 µg LPS/kg Körpergewicht zu einem starken Anstieg der Plasmlaktatspiegel bei Kühen kam (Giri *et al.* 1990). Eine mögliche Erklärung dafür ist eine starke LPS-bedingte Aktivierung von Immunabwehrmechanismen. *In vivo* führt eine LPS-Exposition zudem zu einer hochgradigen Beeinträchtigung des Kreislaufs und dadurch zu einer mangelhaften Durchblutung der inneren Organe und der Muskulatur. Dies hat sowohl eine erhöhte Produktion als auch einen verminderten Abbau von Laktat zur Folge (Giri *et al.* 1990).

Die luteale mRNA Expression von *TNFα* war 60 und 120 min nach Beginn der Behandlung in den Ovarien der LPS-Gruppe signifikant höher als in denen der

Kontrollgruppe. In Übereinstimmung dazu induziert LPS die TNF α -Produktion und die aktivierte Zytokinkaskade (inklusive TNF α) vermittelt dann die Akutphasenreaktion auf Endotoxine (Kushibiki 2011). Funktionelle TNF-Rezeptoren wurden sowohl in steroidogenen als auch endothelialen Zellen des bovinen CL gefunden (Okuda *et al.* 1999, Okuda & Sakumoto 2003). Die Fähigkeit von TNF α , die Lebensdauer des bovinen CL zu regulieren, beruht daher weitgehend auf seiner direkten Wirkung auf die Lutealzellen (Skarzynski *et al.* 2007). In Kulturen steroidogener Lutealzellen hat TNF α dabei einen inhibitorischen Effekt auf die Gonadotropin-stimulierte Sekretion (Benyo & Pate 1992). Dieser Effekt erklärt in der vorliegenden Studie das Unvermögen der LPS-behandelten Ovarien nach der hCG-Stimulation die P₄-Konzentration zu erhöhen. Ausserdem induziert TNF α *via* TNF Rezeptor-1 einerseits durch die Inaktivierung des anti-apoptotischen Proteins Bcl-2 und andererseits durch Stimulation der Expression und der Aktivität der CASP3 die Apoptose der steroidbildenden und der endothelialen Zellen des bovinen CL (Skarzynski *et al.* 2005). Dementsprechend war auch in der vorliegenden Studie die mRNA Expression von CASP3 im Vergleich zur Kontrollgruppe 60, 120 und 180 min nach Beginn der LPS-Behandlung erhöht. Ausserdem konnte 60 und 180 min nach Behandlungsbeginn eine erhöhte mRNA Expression von CASP8 beobachtet werden. Da die Expression von CASP9 nicht beeinflusst wurde, muss von einer grösseren Bedeutung des extrinsischen Apoptose-Signalwegs ausgegangen werden.

Während der ersten 150 min der LPS-Behandlung änderten sich die P₄-Konzentrationen im abfliessenden Perfusat nicht signifikant und unterschieden sich nicht zwischen der LPS- und der Kontrollgruppe. In einer früheren Studie mit unbehandelten isoliert perfundierten Rinderovarien betrugen die P₄-Konzentrationen zwischen 175 und 291 ng/ml (Sturm & Stahler 1971), was auf eine adäquate Freisetzung von P₄ in den Ovarien der vorliegenden Studie hindeutet. Ebenfalls in früheren Studien

durchgeführte Messungen des P_4 -Gehaltes in lutealem Gewebe vor und nach der isolierten Perfusion zeigten, dass die Änderung der P_4 -Konzentration im abfließenden Perfusat durch Unterschiede in der P_4 -Synthese und -Freisetzung und nicht durch Auswaschen von bereits vor der Perfusion im CL vorhandenem P_4 verursacht wurde (Dharmarajan *et al.* 1988). Ausserdem entsprachen die P_4 -Konzentrationen im Perfusat denjenigen, welche im lutealen Gewebe isoliert perfundierter Ovarien synthetisiert wurden (Brannstrom & Flaherty 1995). Daher kann von einer adäquaten sekretorischen Kapazität der Corpora lutea in der vorliegenden Studie ausgegangen werden. Ein initialer Anstieg (innerhalb von 30 min) und darauffolgender Rückgang (bis 9 h) der P_4 -Konzentrationen nach intravenöser LPS-Behandlung, wie *in vivo* aufgezeigt (Herzog *et al.* 2012), konnte jedoch in der vorliegenden Studie nicht beobachtet werden. Unsere Resultate untermauern die Annahme, dass der initiale P_4 -Anstieg nach LPS-Behandlung *in vivo* durch eine Aktivierung der neuroendokrinen Stressachse bedingt und damit adrenalen Ursprungs sein könnte (Kujjo *et al.* 1995, Herzog *et al.* 2012).

Da die Behandlung mit LH oder hCG die P_4 -Produktion diöstrischer Corpora lutea beim Rind signifikant erhöhte (Koos *et al.* 1984, Litch & Condon 1988), wurde in der vorliegenden Studie eine hCG-Stimulation durchgeführt, um die sekretorische Kapazität des CL während der isolierten Perfusion zu überprüfen. Interessanterweise stieg die P_4 -Konzentration in der Kontrollgruppe 30 min nach der hCG-Stimulation signifikant an, wohingegen in der LPS-Gruppe keine Veränderung erfolgte. Beim Rind bindet LH an seinen spezifischen Rezeptor LHCGR und erhöht anschliessend die Synthese von STAR sowie die Aktivität des Zytochrom P450scc und der HSD3B, was letztlich zu einer Erhöhung der P_4 -Sekretion führt (Rekawiecki *et al.* 2005). Bei den Kontroll ovarien der vorliegenden Studie waren die Expressionen von *LHCGR*, *STAR* und *HSD3B* 30 min nach hCG-Stimulation jedoch noch nicht erhöht, obwohl

die P_4 -Konzentration zu dieser Zeit bereits signifikant angestiegen war. In Übereinstimmung mit den vorliegenden Ergebnissen konnte in einer früheren Studie bei dreistündiger Messung bis 6 h nach LH-Stimulation keine erhöhte mRNA Expression von *STAR* und *HSD3B* beobachtet werden (Rekawiecki *et al.* 2005). Darüber hinaus scheint die LH-Ansprechbarkeit mehr von der Empfindlichkeit der Lutealzellen gegenüber LH als von der Anzahl der LH-Rezeptoren abhängig zu sein, da auch während der funktionellen Luteolyse die Lutealzellen eine verminderte Empfindlichkeit gegenüber LH aufweisen, obwohl keine Reduktion von LHCGR erfolgt (Amsterdam *et al.* 2002). Das Ausbleiben eines Anstiegs der P_4 -Konzentrationen nach LPS-Gabe scheint in der vorliegenden Studie eher auf einer Inhibition der lutealen Freisetzung von P_4 als auf der Inhibition seiner Synthese zu beruhen. An ovinen Corpora lutea konnte *in vitro* bereits gezeigt werden, dass die Freisetzung von P_4 nach LH-Stimulation durch eine Kalzium-abhängige Depolarisation der lutealen Zellmembran reguliert wird (Higuchi *et al.* 1976).

Die tieferen P_4 -Konzentrationen bei den LPS-behandelten Ovarien wurden nicht durch erhöhte $PGF_{2\alpha}$ -Konzentrationen ausgelöst, da diese während der Behandlungsphase unverändert blieben. Im Gegensatz dazu ist eine uterine $PGF_{2\alpha}$ -Ausschüttung *in vivo* essentiell für die Reduktion der P_4 -Konzentration, welche während der Luteolyse am Ende des Brunstzyklus beobachtet wird (McCracken *et al.* 1981). Während uterines $PGF_{2\alpha}$ zweifelsfrei mit einer Luteolyse assoziiert werden konnte (Schams & Berisha 2004), ist der luteolytische Effekt von $PGF_{2\alpha}$ lutealen Ursprungs in der vorliegenden Studie fraglich. Nach einer exogenen $PGF_{2\alpha}$ -Behandlung kommt es *in vivo* zu einer Reduktion der mRNA Expression von *PTGFR*, von steroidogenen (*STAR*, *HSD3B*) und angiogenen (*VEGF*, *FGF2*) Faktoren sowie zu einer Zunahme der Expression des vasoaktiven Faktors *EDN1* (Shirasuna *et al.* 2010). Diese für eine Luteolyse typischen Veränderungen entsprachen nicht den Beobachtungen in der

vorliegenden Studie. Abgesehen von einem temporären Anstieg der Expression von *VEGFA*₁₂₁, der eine unspezifische Reaktion auf die LPS-Behandlung darstellt, konnte bei keinem der genannten Parameter ein Unterschied zwischen der Kontroll- und LPS-Gruppe festgestellt werden. Luteales $\text{PGF}_{2\alpha}$ scheint daher in der vorliegenden Studie nicht für die negativen LPS-induzierten Effekte auf das bovine CL verantwortlich zu sein. Ein definitiver Ausschluss einer Beteiligung von $\text{PGF}_{2\alpha}$ an diesen beobachteten Effekten ist mit den vorliegenden Resultaten jedoch nicht möglich und sowohl der numerische Anstieg der $\text{PGF}_{2\alpha}$ -Konzentration als auch die erhöhte mRNA Expression von *PGES* und *PGFS* deuten auf einen sich möglicherweise erst später zeigenden Effekt von $\text{PGF}_{2\alpha}$ hin.

Für die luteale Prostaglandinsynthese (inklusive $\text{PGF}_{2\alpha}$ und PGE_2) stellt $\text{TNF}\alpha$ ebenfalls einen starken Stimulator dar (Okuda *et al.* 1999). In der vorliegenden Studie waren dementsprechend die mRNA Expressionen von *PGES* 120 und 180 min und von *PGFS* 180 min nach Beginn der LPS-Behandlung höher im Vergleich zur Kontrollgruppe. Die erhöhte Expression von *PGFS* bei LPS behandelten Ovarien könnte zudem teilweise die tieferen P_4 -Konzentrationen nach hCG-Stimulation in der LPS-Gruppe erklären, da die mRNA von *PGFS* für die 20α -HSD kodiert, welche wiederum für den Abbau von P_4 im CL verantwortlich ist (Bachelot *et al.* 2009) und somit die P_4 -Konzentration im abfließenden Perfusat erniedrigt. Ausserdem verlieren Lutealzellen, welche die 20α -HSD exprimieren nicht nur die Fähigkeit P_4 zu sezernieren, sondern erleichtern auch die Expression des Todesrezeptors Fas auf ihrer Oberfläche (Stocco *et al.* 2007). Bindet der von Immunzellen exprimierte Fas-Ligand den Fas-Rezeptor, kommt es durch die Aktivierung von CASP8 und CASP3 zur Apoptose (Stocco *et al.* 2007).

Der wichtigste Rezeptor für die Erkennung von LPS ist TLR4 (Akira 2003). LPS bindet aber auch an TLR2, welcher normalerweise mit Peptidoglykanen und

Lipoteichonsäure in Verbindung gebracht wird (Girard *et al.* 2003). Die Expression beider Toll-like Rezeptoren in Rinderovarien konnte bereits bewiesen werden (Vahanan *et al.* 2008). Interessanterweise unterschied sich die Expression von *TLR4* in der vorliegenden Studie nicht zwischen der LPS- und der Kontrollgruppe, wohingegen die Expression des selteneren *TLR2* 180 min nach Behandlungsbeginn in der LPS-Gruppe höher als in der Kontrollgruppe war. Die Bindung von LPS an *TLR2* und -4 initiiert die Signalkaskade, welche in der Freisetzung von $\text{TNF}\alpha$ und anderer Zytokine resultiert (Kannaki *et al.* 2011).

Zusammenfassend kann festgehalten werden, dass LPS die hCG-induzierte P_4 -Sekretion im bovinen CL hemmt, auch wenn jeglicher Einfluss von endometrialem $\text{PGF}_{2\alpha}$ ausgeschlossen ist. Die Reduktion der P_4 -Sekretion scheint vor allem durch einen Anstieg des LPS-induzierten Zytokins $\text{TNF}\alpha$ und apoptotische Faktoren bedingt zu sein. Die Rolle von lutealem $\text{PGF}_{2\alpha}$ bei der Vermittlung der LPS-Wirkung auf das bovine CL muss weiter erforscht werden.

5. Referenzen

- Abrahamsson G, Janson PO & Kullander S** 1990 An in vitro perfusion method for metabolic studies on human postmenopausal ovaries. *Acta obstetricia et gynecologica Scandinavica* **69** 527-532.
- Ahren K, Selstam G & Janson O** 1972 Perfusion of Ovaries in-Vitro and in-Vivo. *Acta Endocrinologica* 285-&.
- Akira S** 2003 Mammalian Toll-like receptors. *Curr Opin Immunol* **15** 5-11.
- Amsterdam A, Hanoch T, Dantes A, Tajima K, Strauss JF & Seger R** 2002 Mechanisms of gonadotropin desensitization. *Mol Cell Endocrinol* **187** 69-74.
- Bachelot A, Beaufaron J, Servel N, Kedzia C, Monget P, Kelly PA, Gibori G & Binart N** 2009 Prolactin independent rescue of mouse corpus luteum life span: identification of prolactin and luteinizing hormone target genes. *Am J Physiol Endocrinol Metab* **297** E676-684.
- Barker AR, Schrick FN, Lewis MJ, Dowlen HH & Oliver SP** 1998 Influence of clinical mastitis during early lactation on reproductive performance of Jersey cows. *J Dairy Sci* **81** 1285-1290.
- Benyo DF & Pate JL** 1992 Tumor necrosis factor-alpha alters bovine luteal cell synthetic capacity and viability. *Endocrinology* **130** 854-860.
- Bjersing L, Cajander S, Damber JE, Janson PO & Kallfelt B** 1981 The isolated perfused rabbit ovary-a model for studies of ovarian function. Ultrastructure after perfusion with different media. *Cell Tissue Res* **216** 471-479.
- Brannstrom M & Flaherty S** 1995 Methodology and characterization of an in vitro perfusion model for the mouse ovary. *J Reprod Fertil* **105** 177-183.
- Chedrese PJ** 2009 *Reproductive Endocrinology: A Molecular Approach*: Springer.

- Coskun A, Coban YK & Ciralik H** 2009 Critical ischemic time for the rat ovary: experimental study evaluating early histopathologic changes. *J Obstet Gynaecol Res* **35** 330-334.
- Couet J, Martel C, Dupont E, Luu-The V, Sirard MA, Zhao HF, Pelletier G & Labrie F** 1990 Changes in 3 beta-hydroxysteroid dehydrogenase/delta 5-delta 4 isomerase messenger ribonucleic acid, activity and protein levels during the estrous cycle in the bovine ovary. *Endocrinology* **127** 2141-2148.
- Dharmarajan AM, Yoshimura Y, Sueoka K, Atlas SJ, Dubin NH, Ewing LL, Zirkin BR & Wallach EE** 1988 Progesterone secretion by corpora lutea of the isolated perfused rabbit ovary during pseudopregnancy. *Biology of reproduction* **38** 1137-1143.
- Erdem H & Guzeloglu A** 2010 Effect of meloxicam treatment during early pregnancy in Holstein heifers. *Reproduction in Domestic Animals* **45** 625-628.
- Fourichon C, Seegers H & Malher X** 2000 Effect of disease on reproduction in the dairy cow: a meta-analysis. *Theriogenology* **53** 1729-1759.
- Geary TW** 2012 Effects of adrenocorticotrophic hormone and flunixin meglumine on pregnancy retention in beef cows. *J Anim Sci* **90** 207-211.
- Gilbert RO, Bosu WT & Peter AT** 1990 The effect of Escherichia coli endotoxin on luteal function in Holstein heifers. *Theriogenology* **33** 645-651.
- Girard R, Pedron T, Uematsu S, Balloy V, Chignard M, Akira S & Chaby R** 2003 Lipopolysaccharides from Legionella and Rhizobium stimulate mouse bone marrow granulocytes via Toll-like receptor 2. *J Cell Sci* **116** 293-302.
- Giri SN, Emau P, Cullor JS, Stabenfeldt GH, Bruss ML, Bondurant RH & Osburn BI** 1990 Effects of endotoxin infusion on circulating levels of eicosanoids, progesterone, cortisol, glucose and lactic acid, and abortion in pregnant cows. *Vet Microbiol* **21** 211-231.

- Giri SN, Stabenfeldt GH, Moseley TA, Graham TW, Bruss ML, BonDurant RH, Cullor JS & Osburn BI** 1991 Role of eicosanoids in abortion and its prevention by treatment with flunixin meglumine in cows during the first trimester of pregnancy. *Zentralbl Veterinarmed A* **38** 445-459.
- Hansen PJ, Soto P & Natzke RP** 2004 Mastitis and fertility in cattle - Possible involvement of inflammation or immune activation in embryonic mortality. *American Journal of Reproductive Immunology* **51** 294-301.
- Herzog K, Struve K, Kastelic JP, Piechotta M, Ulbrich SE, Pfarrer C, Shirasuna K, Shimizu T, Miyamoto A & Bollwein H** 2012 E. coli lipopolysaccharide administration transiently suppresses luteal structure and function in dioestrous cows. *Reproduction*.
- Heuwieser W, Iwersen M & Goetze L** 2011 Efficacy of carprofen on conception rates in lactating dairy cows after subcutaneous or intrauterine administration at the time of breeding. *J Dairy Sci* **94** 146-151.
- Higuchi T, Kaneko A, Abel JH, Jr. & Niswender GD** 1976 Relationship between membrane potential and progesterone release in ovine corpora lutea. *Endocrinology* **99** 1023-1032.
- Honnens A, Niemann H, Herzog K, Paul V, Meyer HH & Bollwein H** 2009 Relationships between ovarian blood flow and ovarian response to eCG-treatment of dairy cows. *Anim Reprod Sci* **113** 1-10.
- Ingec M, Isaoglu U, Yilmaz M, Calik M, Polat B, Alp HH, Kurt A, Gundogdu C & Suleyman H** 2011 Prevention of ischemia-reperfusion injury in rat ovarian tissue with the on-off method. *J Physiol Pharmacol* **62** 575-582.
- Jackson JA, Shuster DE, Silvia WJ & Harmon RJ** 1990 Physiological responses to intramammary or intravenous treatment with endotoxin in lactating dairy cows. *J Dairy Sci* **73** 627-632.

- Janeway CA, Beginnen K, Travers P, Er-Siller IH, Seidler L & Walport M** 2002
Immunologie: Spektrum Akad. Verl.
- Janson PO, Amato F, Weiss TJ, Ralph MM & Seamark RF** 1978 On the isolated perfused sheep ovary as a model for the study of ovarian function. *Fertility and Sterility* **30** 230-236.
- Jaroszewski J, Skarzynski D & Hansel W** 2003 Nitric oxide as a local mediator of prostaglandin F₂ α -induced regression in bovine corpus luteum: an in vivo study. *Experimental Biology and Medicine* **228** 1057-1062.
- Kannaki TR, Shanmugam M & Verma PC** 2011 Toll-like receptors and their role in animal reproduction. *Anim Reprod Sci* **125** 1-12.
- Koos RD, Jaccarino FJ, Magaril RA & Le Maire WJ** 1984 Perfusion of the rat ovary in vitro: methodology, induction of ovulation, and pattern of steroidogenesis. *Biology of reproduction* **30** 1135-1141.
- Korzekwa AJ, Jaroszewski JJ, Woclawek-Potocka I, Bah MM & Skarzynski DJ** 2008 Luteolytic effect of prostaglandin F₂ α on bovine corpus luteum depends on cell composition and contact. *Reproduction in Domestic Animals* **43** 464-472.
- Kujjo LL, Bosu WT & Perez GI** 1995 Opioid peptides involvement in endotoxin-induced suppression of LH secretion in ovariectomized Holstein heifers. *Reprod Toxicol* **9** 169-174.
- Kushibiki S** 2011 Tumor necrosis factor- α -induced inflammatory responses in cattle. *Anim Sci J* **82** 504-511.
- Lavon Y, Leitner G, Goshen T, Braw-Tal R, Jacoby S & Wolfenson D** 2008 Exposure to endotoxin during estrus alters the timing of ovulation and hormonal concentrations in cows. *Theriogenology* **70** 956-967.

- LeBlanc SJ, Duffield TF, Leslie KE, Bateman KG, Keefe GP, Walton JS & Johnson WH** 2002 Defining and diagnosing postpartum clinical endometritis and its impact on reproductive performance in dairy cows. *J Dairy Sci* **85** 2223-2236.
- Litch SJ & Condon WA** 1988 Interaction of hCG and Lutalyse on steroidogenesis of bovine luteal cells. *Mol Cell Endocrinol* **57** 81-85.
- Livak KJ & Schmittgen TD** 2001 Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods* **25** 402-408.
- Lüttgenau J, Ulbrich SE, Beindorff N, Honnens A, Herzog K & Bollwein H** 2011 Plasma progesterone concentrations in the mid-luteal phase are dependent on luteal size, but independent of luteal blood flow and gene expression in lactating dairy cows. *Anim Reprod Sci* **125** 20-29.
- Mattos R, Staples CR, Williams J, Amorocho A, McGuire MA & Thatcher WW** 2002 Uterine, ovarian, and production responses of lactating dairy cows to increasing dietary concentrations of menhaden fish meal. *J Dairy Sci* **85** 755-764.
- McCracken JA, Custer EE & Lamsa JC** 1999 Luteolysis: a neuroendocrine-mediated event. *Physiological reviews* **79** 263-323.
- McCracken JA, Schramm W, Barcikowski B & Wilson L, Jr.** 1981 The identification of prostaglandin F2 alpha as a uterine luteolytic hormone and the hormonal control of its synthesis. *Acta Vet Scand Suppl* **77** 71-88.
- Merrill ML, Ansotegui RP, Burns PD, MacNeil MD & Geary TW** 2007 Effects of flunixin meglumine and transportation on establishment of pregnancy in beef cows. *J Anim Sci* **85** 1547-1554.

- Mills RC & Morrisette MC** 1970 Progesterone synthesis by perfused bovine ovaries of early and late pregnancy. *J Reprod Fertil* **22** 435-440.
- Mishra DP & Dhali A** 2007 Endotoxin induces luteal cell apoptosis through the mitochondrial pathway. *Prostaglandins Other Lipid Mediat* **83** 75-88.
- Miyamoto Y, Skarzynski DJ & Okuda K** 2000 Is tumor necrosis factor alpha a trigger for the initiation of endometrial prostaglandin F(2alpha) release at luteolysis in cattle? *Biology of reproduction* **62** 1109-1115.
- Niswender GD** 2002 Molecular control of luteal secretion of progesterone. *Reproduction* **123** 333-339.
- Niswender GD, Davis TL, Griffith RJ, Bogan RL, Monser K, Bott RC, Bruemmer JE & Nett TM** 2007 Judge, jury and executioner: the auto-regulation of luteal function. *Soc Reprod Fertil Suppl* **64** 191-206.
- Okuda K & Sakumoto R** 2003 Multiple roles of TNF super family members in corpus luteum function. *Reprod Biol Endocrinol* **1** 95.
- Okuda K, Sakumoto R, Uenoyama Y, Berisha B, Miyamoto A & Schams D** 1999 Tumor necrosis factor alpha receptors in microvascular endothelial cells from bovine corpus luteum. *Biol Reprod* **61** 1017-1022.
- Rabaglino MB, Risco CA, Thatcher MJ, Lima F, Santos JE & Thatcher WW** 2010 Use of a five-day progesterone-based timed AI protocol to determine if flunixin meglumine improves pregnancy per timed AI in dairy heifers. *Theriogenology* **73** 1311-1318.
- Rekawiecki R, Kowalik MK, Slonina D & Kotwica J** 2008 Regulation of progesterone synthesis and action in bovine corpus luteum. *J Physiol Pharmacol* **59 Suppl 9** 75-89.
- Rekawiecki R, Nowik M & Kotwica J** 2005 Stimulatory effect of LH, PGE2 and progesterone on StAR protein, cytochrome P450 cholesterol side chain

cleavage and 3beta hydroxysteroid dehydrogenase gene expression in bovine luteal cells. *Prostaglandins Other Lipid Mediat* **78** 169-184.

Richter O, Wardelmann E, Dombrowski F, Schneider C, Kiel R, Wilhelm K, Schmolling J, Kupka M, van der Ven H & Krebs D 2000 Extracorporeal perfusion of the human uterus as an experimental model in gynaecology and reproductive medicine. *Hum Reprod* **15** 1235-1240.

Romanoff EB & Pincus G 1962 Studies of the isolated perfused ovary: methods and examples of application. *Endocrinology* **71** 752-755.

Rossetti RC, Perdigao A, Mesquita FS, Sa Filho M, Nogueira GP, Machado R, Membrive CM & Binelli M 2011 Effects of flunixin meglumine, recombinant bovine somatotropin and/or human chorionic gonadotropin on pregnancy rates in Nelore cows. *Theriogenology* **76** 751-758.

Sakumoto R, Vermehren M, Kenngott RA, Okuda K & Sinowatz F 2011 Localization of gene and protein expressions of tumor necrosis factor- α and tumor necrosis factor receptor types I and II in the bovine corpus luteum during the estrous cycle. *J Anim Sci* **89** 3040-3047.

Scenna FN, Hockett ME, Towns TM, Saxton AM, Rohrbach NR, Wehrman ME & Schrick FN 2005 Influence of a prostaglandin synthesis inhibitor administered at embryo transfer on pregnancy rates of recipient cows. *Prostaglandins Other Lipid Mediat* **78** 38-45.

Schams D & Berisha B 2004 Regulation of corpus luteum function in cattle--an overview. *Reproduction in Domestic Animals* **39** 241-251.

Shirasuna K, Sasahara K, Matsui M, Shimizu T & Miyamoto A 2010 Prostaglandin F $_{2\alpha}$ differentially affects mRNA expression relating to angiogenesis, vasoactivation and prostaglandins in the early and mid corpus luteum in the cow. *J Reprod Dev* **56** 428-436.

- Skarzynski D, Woclawek Potocka I, Korzekwa A, Bah M, Piotrowska K, Barszczewska B & Okuda K** 2007 Infusion of exogenous tumor necrosis factor dose dependently alters the length of the luteal phase in cattle: differential responses to treatment with indomethacin and L-NAME, a nitric oxide synthase inhibitor. *Biology of reproduction* **76** 619-627.
- Skarzynski DJ, Ferreira-Dias G & Okuda K** 2008 Regulation of luteal function and corpus luteum regression in cows: hormonal control, immune mechanisms and intercellular communication. *Reproduction in Domestic Animals* **43 Suppl 2** 57-65.
- Skarzynski DJ, Jaroszewski JJ & Okuda K** 2005 Role of tumor necrosis factor- α and nitric oxide in luteolysis in cattle. *Domest Anim Endocrinol* **29** 340-346.
- Skarzynski DJ, Miyamoto Y & Okuda K** 2000 Production of prostaglandin f(2 α) by cultured bovine endometrial cells in response to tumor necrosis factor α : cell type specificity and intracellular mechanisms. *Biol Reprod* **62** 1116-1120.
- Slough TL, Rispoli LA, Carnevale EM, Niswender GD & Bruemmer JE** 2011 Temporal gene expression in equine corpora lutea based on serial biopsies in vivo. *J Anim Sci* **89** 389-396.
- Stahler E, Buchholz R & Huch A** 1971 [Studies on the energy metabolism in isolated perfused human ovaries]. *Arch Gynakol* **211** 576-582.
- Stahler E & Huch A** 1971 [Studies of the isolated perfused bovine ovaries]. *Arch Gynakol* **211** 527-544.
- Stocco C, Telleria C & Gibori G** 2007 The molecular control of corpus luteum formation, function, and regression. *Endocr Rev* **28** 117-149.

- Stocco DM & Clark BJ** 1996 Role of the steroidogenic acute regulatory protein (StAR) in steroidogenesis. *Biochem Pharmacol* **51** 197-205.
- Sturm G & Stahler E** 1971 [Studies on steroid biosynthesis of in-vitro perfused bovine ovaries in various functional phases]. *Arch Gynakol* **211** 545-557.
- Suzuki C, Yoshioka K, Iwamura S & Hirose H** 2001 Endotoxin induces delayed ovulation following endocrine aberration during the proestrous phase in Holstein heifers. *Domest Anim Endocrinol* **20** 267-278.
- Tsai SJ, Kot K, Ginther OJ & Wiltbank MC** 2001 Temporal gene expression in bovine corpora lutea after treatment with PGF₂alpha based on serial biopsies in vivo. *Reproduction* **121** 905-913.
- Ulbrich SE, Schulke K, Groebner AE, Reichenbach HD, Angioni C, Geisslinger G & Meyer HH** 2009 Quantitative characterization of prostaglandins in the uterus of early pregnant cattle. *Reproduction* **138** 371-382.
- Vahanan BM, Raj GD, Pawar RM, Gopinath VP, Raja A & Thangavelu A** 2008 Expression profile of toll like receptors in a range of water buffalo tissues (*Bubalus bubalis*). *Vet Immunol Immunopathol* **126** 149-155.
- von Krueger X & Heuwieser W** 2010 Effect of flunixin meglumine and carprofen on pregnancy rates in dairy cattle. *J Dairy Sci* **93** 5140-5146.
- Walsh SW, Williams EJ & Evans AC** 2011 A review of the causes of poor fertility in high milk producing dairy cows. *Anim Reprod Sci* **123** 127-138.
- Williams EJ, Fischer DP, Noakes DE, England GCW, Rycroft A, Dobson H & Sheldon IM** 2007 The relationship between uterine pathogen growth density and ovarian function in the postpartum dairy cow. *Theriogenology* **68** 549-559.
- Williams EJ, Sibley K, Miller AN, Lane EA, Fishwick J, Nash DM, Herath S, England GC, Dobson H & Sheldon IM** 2008 The effect of *Escherichia coli*

lipopolysaccharide and tumour necrosis factor alpha on ovarian function.

American Journal of Reproductive Immunology **60** 462-473.

Wiltbank MC & Ottobre JS 2003 Regulation of intraluteal production of prostaglandins. *Reprod Biol Endocrinol* **1** 91.

Danksagung

Ich möchte allen danken, die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben:

- Prof. Dr. Heinrich Bollwein sowohl für die Überlassung dieses herausfordernden und sehr interessanten Themas als auch für die sehr grosse finanzielle und fachliche Unterstützung
- Dr. Johannes Lüttgenau für die Vermittlung von Kontakten, die fachliche Beratung und die äusserst grosse Hilfe beim Verfassen dieser Arbeit
- Prof. Dr. Susanne Ulbrich und Dr. David Kradolfer für die PCR- und Prostaglandinanalysen
- Prof. Dr. Rupert Bruckmaier und PD Dr. Olga Wellnitz für die Metaboliten- und Progesteronanalysen
- Prof. Dr. Fredi Janett und Mathias Siuda für die Bereitstellung der Reagenzien und die Kryokonservierung der Biopate
- Prof. Dr. Johannes Vogel für die Beratung und die Bereitstellung von Ausrüstung und Material bei der Herstellung der Oxygenatoren
- Prof. Dr. Akio Miyamoto für die Beratung in verschiedenen Fragen sowohl zu physiologischen Vorgängen im bovinen CL als auch zu pathophysiologischen Auswirkungen von LPS auf das bovine CL
- Prof. Dr. Manfred Kietzmann für die Beantwortung allgemeiner perfusions-technischer Fragen
- Dr. Clemens Bauer für das Gastrecht und die tatkräftige Unterstützung bei der Organentnahme am Schlachthof Zürich
- Patricia Egli und Sophie Peterhans für die unentbehrliche operative Assistenz bei der Entnahme, Präparation und Perfusion der Ovarien